



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

INTERAKCE HYALURONAN-AMINOKYSELINY

HYALURONAN-AMINO ACIDS INTERACTIONS

AUTOREFERÁT DIZERTAČNÍ PRÁCE

SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

ŠKOLITEL

SUPRVISOR

Ing. Adam Jugl

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

BRNO 2020

ABSTRAKT

Předložená dizertační práce se zaměřuje na nekovalentní interakce hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech (9–1540 kDa) s bazickými (oligo)aminokyselinami (především argininem) a antimikrobiálním peptidem cecropinem B. Pro zkoumání interakcí byly zvoleny techniky ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením (HR-US), izotermické titrační kalorimetrie (ITC) a potenciometrických titrací. Práce se zaměřuje na charakterizaci interakcí zejména s ohledem na použitou molekulovou hmotnost interagujících polymerů a iontovou sílu prostředí. O tom, zda budou interakce probíhat, či nikoliv, rozhodovala především délka řetězce oligomerního argininu. U monomerních aminokyselin byly interakce zkoumány především za využití potenciometrických titrací. Interakce byly pozorovatelné od oligomerů argininu s osmi monomerními jednotkami. Molekulová hmotnost hyaluronanu ovlivňovala zejména intenzitu interakcí. Významný byl především přechod mezi jednotlivými konformacemi hyaluronanu (tyčinkou a náhodným klubkem). Zkoumání interakcí bylo prováděno ve vodě, v roztocích s různou koncentrací chloridu sodného a v PBS. Dostatečně vysoká iontová síla roztoku dokázala potlačit ve vodě probíhající interakce mezi oligomery argininu a hyaluronanem. Bylo prokázáno, že bazický antimikrobiální peptid cecropin B interaguje s hyaluronanem ve vodě, ale nikoliv v prostředí PBS. Na základě těchto výsledků bylo možné usuzovat, že systém hyaluronan-cecropin B by byl vhodný zejména pro topické aplikace.

ABSTRACT

The presented dissertation focuses on non-covalent interactions of hyaluronan of different molecular weights (9–1540 kDa) with basic (oligo)-amino acids (especially arginine) and the antimicrobial peptide cecropin B. High-resolution ultrasonic spectroscopy (HR-US), isothermal titration calorimetry (ITC) and potentiometric titration techniques were chosen to investigate the interactions. The thesis focuses on the characterization of interactions, especially with respect to the used molecular weight of interacting polymers and the ionic strength of the environment. Whether interactions occur or not was determined primarily by the length of the arginine oligomer chain. For monomeric amino acids, the interactions were investigated mainly by potentiometric titrations. Interactions were observable from arginine oligomers with eight monomer units. The molecular weight of hyaluronan mainly affected the intensity of the interactions. The transition between the individual conformations of hyaluronan (rod and random coil) was especially significant. Investigation of interactions was performed in water, in solutions with different concentrations of sodium chloride and in PBS. The sufficiently high ionic strength of the solution was able to suppress the interactions in water between the oligomers of arginine and hyaluronan. The basic antimicrobial peptide cecropin B has been shown to interact with hyaluronan in water but not in PBS. Based on these results, it was possible to conclude that the hyaluronan-cecropin B system would be particularly suitable for topical applications.

KLÍČOVÁ SLOVA

ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením, izotermická titrační kalorimetrie, potenciometrické titrace, cecropin B, arginin, lysin, hyaluronan

KEYWORDS

high resolution ultrasound spectroscopy, isothermal titration calorimetry, potentiometric titration, cecropin B, arginine, lysine, hyaluronan

OBSAH

ÚVOD.....	5
1 CÍLE PRÁCE	6
2 TEORETICKÁ ČÁST; SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ.....	7
2.1 Elektrostatické komplexace hyaluronanu	8
2.1.1 Interakce s aminokyselinami.....	8
2.1.2 Interakce s proteiny.....	9
2.2 Antimikrobiální peptidy.....	10
2.2.1 Interakce kationtových AMP.....	10
2.3 Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením.....	11
2.3.1 Princip měření.....	11
2.3.2 Využití HR-US v praxi.....	11
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	13
3.1 Použité přístroje	13
3.2 Standardní příprava vzorků.....	13
3.2.1 Použité chemikálie	13
3.2.2 Příprava roztoků hyaluronanu.....	13
3.2.3 Příprava roztoků (poly)aminokyselin.....	14
3.2.4 Příprava roztoků cecropinu B.....	15
3.2.5 Molární poměr	15
3.2.6 Zpracování dat HR-US.....	15
3.2.7 Zpracování dat ITC.....	16
4 VÝZNAMNÉ VÝSLEDKY A DISKUSE.....	17
4.1 Potenciometrické titrace.....	17
4.1.1 Výsledky	17
4.1.2 Diskuse	18
4.2 Interakce hyaluronan-arginin studované pomocí HR-US a ITC.....	20
4.2.1 Výsledky	20
4.2.2 Diskuse	28
4.3 Interakce hyaluronan-cecropin B studované pomocí HR-US a ITC.....	32
4.3.1 Výsledky	32
4.3.2 Diskuse	34
5 ZÁVĚR.....	37
6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	39
7 ŽIVOTOPIS.....	45
8 PŘÍLOHY.....	48

ÚVOD

Hyaluronan je za fyziologického pH záporně nabitý polysacharid. Jedná se o látku vlastní všem obratlovcům a nachází se tedy i v lidském těle, kde plní řadu důležitých funkcí. Hyaluronan v organismu běžně interaguje s aminokyselinami. Řada z nich je součástí větších celků, především buněčných receptorů, na které se hyaluronan váže. Důsledkem intenzivního výzkumu bylo především v posledních letech rozšířeno využití hyaluronanu v oblasti medicíny (přípravky na hojení ran), kosmetiky (krémy s přídavkem hyaluronanu) i farmacie (oční kapky).

Současný trend výzkumu hyaluronanu je orientován směrem k cílené distribuci léčiv, kde by hyaluronan mohl sehrát důležitou roli především s ohledem na jeho vztah k rakovinným buňkám. Protože se jedná o polyanion, modifikace by mohly být nekovalentního charakteru (elektrostatické). V první fázi výzkumu se k modifikaci využívaly kationtové tenzidy. Vzhledem k lepší biokompatibilitě jsou však zkoumány i možné interakce s kladně nabitými aminokyselinami a proteiny. Jako zajímavé se z proteinů jeví antimikrobiální peptidy, z nichž některé mají i experimentálně prokázané selektivní protirakovinné účinky.

Některé studie již ukázaly na možnost tvorby nosičových systémů složených z hyaluronanu a oligomerních aminokyselin pro nukleové kyseliny, nicméně v žádné ze studií zatím nebyly dopodrobna rozebrány vlastnosti interakcí mezi hyaluronanem a oligomerní aminokyselinou, které tyto nosičové systémy tvoří.

Pro studium těchto interakcí mezi hyaluronanem a aminokyselinami, respektive antimikrobiálními peptidy byly vybrány metody ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením (HR-US), izotermické titrační kalorimetrie (ITC) a potenciometrické titrace. HR-US i ITC jsou metody velmi citlivé na molekulární uspořádání a nevyžadují žádnou modifikaci vzorků.

1 CÍLE PRÁCE

Předložená dizertační práce je zaměřena na studium fyzikálně-chemických interakcí hyaluronanu, jehož molekulová hmotnost se pohybuje v intervalu 9–1540 kDa jednak s bazickými (oligo)aminokyselinami argininem a lysinem, jednak s kationtovým antimikrobiálním peptidem cecropinem B. Tyto interakce jsou studovány s využitím potenciometrických titrací, ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením (HR-US) a izotermické titrační kalorimetrie (ITC) pro získání základních termodynamických parametrů interakcí.

V teoretické části práce je pozornost zaměřena na již známé vlastnosti jednotlivých látek (hyaluronanu, (oligo)aminokyselin, a antimikrobiálních peptidů) společně s jejich praktickými aplikacemi, zejména s přihlédnutím na elektrostatické komplexace. Kromě těchto látek jsou popsány také možnosti využití HR-US a ITC pro studium polyelektrolytových a elektrostatických interakcí.

Interakce s oligomerními argininovými řetězci jsou zkoumány zejména s ohledem na fakt, že se v literatuře objevují systémy využívající těchto oligomerů kombinovaných s hyaluronanem jako součást nosičových systémů pro nukleové kyseliny, avšak v žádné z publikací se neřeší původ a vlastnosti těchto interakcí. Hyaluronan navíc v organismu běžně interaguje s aminokyselinami, které jsou součástí buněčných receptorů, na které se hyaluronan váže. Oligomerní argininové řetězce tedy slouží i jako zjednodušený model interakčního centra buněčných receptorů. Cílem je popsat tyto interakce a zjistit, zda a za jakých podmínek probíhají.

První zvolenou technikou použitou v experimentální části práce s cílem určit, zda v systému probíhají interakce, jsou potenciometrické titrace, které jsou využívány pro monomerní arginin a lysin. V průběhu potenciometrických titrací je s pomocí kombinované elektrody zaznamenáváno pH roztoků a na jeho základě je usuzováno, zda v systému interakce probíhají, či nikoliv.

V případě oligomerních aminokyselin je cílem charakterizovat vliv molekulové hmotnosti oligomeru stejně jako hyaluronanu na interakce v prostředí vody, PBS a prostředích o různé koncentraci chloridu sodného za využití technik HR-US a ITC.

Na základě zkušeností z experimentů prováděných s oligomerními argininovými řetězci jsou navrženy a realizovány experimenty s antimikrobiálním peptidem cecropinem B. Práce je zaměřena na prozkoumání vlastností interakcí tohoto bazického antimikrobiálního peptidu s hyaluronanem o různé molekulové hmotnosti a je studován vliv různých prostředí (voda, PBS) za využití technik HR-US a ITC. Zde se jedná o základní charakterizaci interakcí mezi peptidem a polysacharidem s ohledem na možné využití komplexů hyaluronan-cecropin B pro biologické aplikace.

2 TEORETICKÁ ČÁST; SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ

Hyaluronan se vyskytuje v tkáních všech obratlovců [1]. Produkují ho také některé bakterie (*Streptococcus*, *Pasteurella*), ale nenajdeme ho u hub, rostlin a hmyzu [2]. Jedná se o jednu ze základních složek extracelulární matrix [3].

Bylo objeveno mnoho rolí, které plní hyaluronan v lidském těle, jako je regulace vodní rovnováhy, osmotického tlaku, stabilizaci struktur díky elektrostatické interakci [4] nebo ovlivňování difuze velkých molekul [5].

Za fyziologického pH jsou všechny karboxylové skupiny ve struktuře hyaluronanu disociovány, neboť hodnota disociační konstanty odpovídá $pK_a = 2,9-4$ [6, 7] v závislosti na iontové síle.

Hyaluronan je lineární, záporně nabitý polysacharid. Každá disacharidová jednotka hyaluronanu odpovídá přibližně 400 Da. Ve fyziologickém prostředí se z hyaluronanu stává polyanion, který má ve své struktuře přidružené výměnné ionty, aby celá jeho struktura byla elektroneutrální [8].

Za fyziologických podmínek je struktura hyaluronanu tvořena chemickými vazbami tvořícími základ disacharidových jednotek a intramolekulárních vodíkových můstků, které jsou obtížně rozlišitelné s vodíkovými můstky tvořenými s molekulami vody [9].

V roztoku dochází k tvorbě ploché, stuhu připomínající, kroucí se struktury [10], která obsahuje rozsáhlá pravidelně se opakující hydrofobní místa [11]. Kromě hydrofobních oblastí pomáhají hyaluronanu udržovat jeho sekundární strukturu i intermolekulární vodíkové můstky [12].

Hyaluronan o vysoké molekulové hmotnosti existuje ve vodných roztocích v konformaci náhodného klubka, naopak polymery s nižší molekulovou hmotností mají tyčinkovitou konformaci [13]. Jako hraniční molekulová hmotnost, kde se konformace mění, se jeví 90–130 kDa [14].

Hyaladheriny jsou heterogenní skupinou proteinů, které mají schopnost vázat hyaluronan [15]. U většiny proteinů vážících hyaluronan je za vazbu odpovědná doména asi 100 aminokyselin, známá jako „Link module“ [3, 16, 17].

První popsáný receptor pro hyaluronan – CD44 [18] je zároveň hlavní buněčný receptor pro hyaluronan [19]. Optimální velikost pro vazbu s receptorem CD44 se zdá být již hexasacharid [20, 21]. Řetězce delší než 20 monomerních jednotek hyaluronanu mají schopnost interagovat s dvěma CD44 receptory [20, 22]. Schopnost vazby s receptorem mají ale i kratší fragmenty přibližně mezi 3 a 5 disacharidovými jednotkami [19].

Vazba hyaluronanu k receptoru je řízena především tvarem a možností vytvářet vodíkové můstky [23]. Iontové interakce ve fyziologickém roztoku přispívají do celkové energie interakce přibližně 25 %, navíc jsou velmi závislé na velikosti iontové síly [22]. Kontakt receptoru s hyaluronanem je řízen pomocí vodíkových můstků a van der Waalových sil, spíše než elektrostatických interakcí nebo patrových interakcí [23–25]. Celkem 13 aminokyselinových zbytků se podílí na

interakci s hyaluronanem. Velkou část zprostředkovávají alifatické zbytky, zbylou část zbytky aromatických a bazických aminokyselin [23].

Řada z těchto receptorů bývá ve zvýšené míře exprimována v rakovinných buňkách, což z nich vhodný cíl pro hyaluronanem naváděná léčiva [26].

2.1 ELEKTROSTATICKE KOMPLEXACE HYALURONANU

Elektrostatická vazba nízkomolekulárních ligandů na hyaluronan byla studována řadou technik, jako je fluorescenční spektroskopie, izotermická titrační kalorimetrie [27], dynamický rozptyl světla nebo počítačové modelování [28].

S využitím konduktometrie byl analyzován vznik komplexů mezi hyaluronanem a chitosanem, dvěma přírodními polymery, a byla testována stabilita těchto komplexů v různých podmínkách [29]. Bylo zjištěno, že pro tvorbu elektrostaticky tvořených nanočástic s hyaluronanem je vhodný středně acetylovaný chitosan. Pouze v takovém případě jsou vzniklé částice stabilní a zároveň vhodné k interakci s buňkami [30].

Studovány byly také elektrostatické komplexace hyaluronanu spolu s kationtovými surfaktanty s využitím ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením [31]. Bylo odhaleno několik různých typů interakcí mezi hyaluronanem a tenzidy v závislosti na koncentraci tenzidu. Kromě elektrostatických interakcí jsou pravděpodobné i hydrofobní interakce, neboť vliv na výsledný profil titrace měla i délka hydrofobního řetězce surfaktantu.

2.1.1 Interakce s aminokyselinami

Myšlenka využití elektrostatické interakce hyaluronanu s aminokyselinami není revoluční. Již bylo dokázáno, že hyaluronan s polyaminokyselinami ve vhodných podmínkách interaguje [32]. Jako důležité se jeví především pH a iontová síla, přičemž pokud klesne pH na hodnotu kolem 2,5, není prakticky možné pozorovat žádné interakce, neboť karboxylové skupiny hyaluronanu zajišťující interakci nejsou nadále disociované [6, 7].

Výzkum v tomto případě navazuje na poznatky interakcí mezi hyaluronanem a kationtovými tenzidy, které podobně jako aminokyseliny za určitých podmínek nesou na atomu dusíku kladný náboj a jsou proto schopny elektrostatické interakce se záporně nabitou karboxylovou skupinou hyaluronanu. V tomto ohledu je důležitá především práce Kargerové [31], která se zabývá studiem interakcí hyaluronanu a kationtového tenzidu pomocí ultrazvukové spektroskopie.

K měření interakcí mezi aminokyselinami a hyaluronanem byly využívány různé metody, jako je potenciometrie, konduktometrie [33] nebo reologie [32]. Bylo zjištěno, že velký vliv na sílu interakcí má především iontová síla roztoku a také pH, při kterém dochází k interakcím mezi aminokyselinou a hyaluronanem [32, 34]. Vysoká iontová síla roztoku má za následek odstínění elektrostatických interakcí.

Z aminokyselin byly zkoumány arginin a lysin, především s ohledem na možnost nést větší celkový kladný náboj. Podle výpočtů (density functional theory) tvoří arginin spolu s hyaluronanem více rigidní struktury, naopak lysin více flexibilní [32].

Roztok hyaluronanu byl míchán s roztokem polyargininu za vzniku nanočástic. Jejich vlastnosti (zeta potenciál) závisely na hmotnostním poměru mísených polymerů. Zároveň systémy s molekulovou hmotností hyaluronanu 165 kDa zůstávaly na rozdíl od nízkomolekulárního hyaluronanu stabilní ve fyziologickém prostředí [35].

Elektrostatická komplexace hyaluronanu byla také použita pro cílenou distribuci siRNA. Hyaluronan (Hya, 19 kDa) interagoval s poly L-argininem ve vodném prostředí a výsledný komplex byl použit pro interakci se siRNA a její cílenou distribuci. Účinnost závisela především na množství exprimovaného receptoru CD44 na povrchu buněk a molekulové hmotnosti hyaluronanu [36].

2.1.2 Interakce s proteiny

Interakce mezi proteiny a polysacharidy za tvorby komplexů mohou být hnané entalpicky i entropicky v závislosti na hustotě náboje makromolekul. Slabě nabité proteiny a polysacharidy vytváří komplexy pomocí elektrostatických sil (entalpický příspěvek), ale formování těchto komplexů a agregátů u silně nabitých polyelektrolytů je často hnáno entropicky, pravděpodobně pomocí uvolněných protiiontů a molekul vody a konformačních změn polymerů při interakci [37]. Vazebná afinita polyelektrolytu k proteinu (BSA) je silně ovlivněna třemi strukturními parametry polyelektrolytu: roste s flexibilitou řetězce (v případě hyaluronanu se jedná o tuhý polyelektrolyt) a mobilitou náboje, v případě hustoty náboje je problematika komplexnější [38]. Tuhý polymerní řetězec jako je hyaluronan nedokáže efektivně měnit svoji konformaci tak, aby byl ideálně schopen využít vazeb k opačným nábojům na proteinu a zároveň díky změně konformace nedocházelo k výrazným odpudivým interakcím se stejně nabitými skupinami na proteinu [39].

Bylo prokázáno, že BSA a hyaluronan je schopný elektrostatické komplexace kolem pH 4, nezávisle na délce hyaluronanu v rozsahu 1 000–1 milion $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ [40]. Rozpuštěnost tohoto komplexu je však závislá na délce hyaluronanového řetězce. Jednu molekulu BSA je možné obalit více krátkými řetězci hyaluronanu, naopak dlouhá molekula hyaluronanu může interagovat s více molekulami BSA [41]. Komplexy mohou vznikat trojího typu, a to neutrálně nabitě, pozitivní nebo negativní dle poměru hyaluronanu a albuminu. [40].

Elektrostatické interakce by však měly fungovat i za fyziologické iontové síly a pH [41]. Při interakci mezi hyaluronanem a BSA v čisté vodě docházelo k zakalení roztoku, ale při iontové síle 150 mM roztok zůstal čirý. Formování komplexů bylo zjišťováno pomocí UV-VIS [40].

Naopak lysozym, který má izoelektrický bod vyšší, než albumin formoval komplexy i v hodnotách pH výrazně vyšších (pH 3–9) [42]. Pomocí maloúhlového rozptylu neutronů (SANS) byla studována struktura komplexů hyaluronanu spolu s lysozymem. Komplexy měly rozdílné struktury především v závislosti na poměru nábojů. Interakce mezi hyaluronanem a lysozymem má elektrostatickou povahu, což dokazuje především její stínění při zvýšené iontové síle (137 mM) [43].

Byly studovány také komplexy hyaluronanu a hedvábného fibrinu. Tyto komplexy existují v pH oblasti 2,5–3,5 a komplexy se formují především pomocí elektrostatických interakcí [44].

2.2 ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY

Antimikrobiální peptidy (AMP) se vyskytují v širokém spektru organismů [26]. Většina přírodních AMP je kationtových s průměrným kladným nábojem +3,2 [45].

Základním znakem kationtových AMP je schopnost molekuly zaujmout takový tvar, ve kterém jsou hydrofobní aminokyseliny (I, V, F, Y, W [46], více než 30 % [47]), hydrofilní aminokyseliny a aminokyseliny nesoucí kladný náboj (R, K [46]) prostorově uspořádány do samostatných sektorů v molekule za tvorby tzv. amfifilní struktury [46, 48, 49], přestože v roztoku se vyskytují v konformaci náhodného klubka [26]. Většina AMP má díky většímu množství aminokyselinových zbytků nesoucí kladný náboj (arginin, lysin [50]) celkový náboj +2 až +9 [51].

AMP jsou zatím využívány především v topických aplikacích [52]. Pro uchovávání potravin je už řadu let využíván peptid ambicin [53] a nisin [54].

Magaininy, tachyplesin, cecropin B a BMAP-28 jsou přírodní AMP, u kterých je velký potenciál stát se novou třídou léčiv proti rakovině [26].

2.2.1 Interakce kationtových AMP

Byly zjišťovány účinky AMP LL-37 při reakci s biokompatibilními polysacharidy (hyaluronan, alginát). Bylo zjištěno, že LL-37 intenzivněji reaguje s alginátem v porovnání s hyaluronanem především díky rozdílné nábojové hustotě obou polysacharidů. Interakce byly zkoumány v prostředí fosfátového pufru ve dvou iontových silách (20 mM a 150 mM) pomocí cirkulárního dichroismu. Bylo zjištěno že LL-37 formuje svoji helikální strukturu především při interakci s alginátem, u hyaluronanu pouze v prostředí nižší iontové síly. Interakce mezi polysacharidem a AMP je tedy pravděpodobně elektrostatická a hydrofobní interakce s hydrofobními oblastmi hyaluronanového řetězce nebyly objeveny [55].

Byly studovány interakce několika záporně nabitých polymerů (hyaluronan, karboxymethylcelulóza, xantan) spolu s ozarelixem (kationtovým dekaeptidem). Byly zjišťovány vlivy polyelektrolytů, jako je velikost nebo hustota náboje na formování polyelektrolytových komplexů spolu s peptidem. Pomocí transmisní elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že hyaluronan o vysoké molekulové hmotnosti tvoří extra dlouhé agregáty (delší než 5 μm), ve kterých individuální vlákna o velikosti 8 nm agregovala do větších [56].

Izotermická titrační kalorimetrie byla použita k určení disociační konstanty a dalších termodynamických parametrů. Hyaluronan dosahoval nejsilnější vazby ze všech zkoumaných elektrolytů (přestože má nejmenší hustotu nábojů). To dokazuje, že nejenom elektrostatické vazby ale i hydrofobní interakce hrají při tvorbě agregátů významnou roli [56].

2.3 ULTRAZVUKOVÁ SPEKTROSKOPIE S VYSOKÝM ROZLIŠENÍM

Podobně jako ostatní spektroskopické techniky, které využívají elektromagnetické záření, je ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením (HR-US), z anglického high resolution ultrasonic spectroscopy, taktéž spektroskopickou technikou. Pro analýzu, na rozdíl od ostatních spektroskopií, využívá zvukových vln o vysoké frekvenci (řádově MHz).

2.3.1 Princip měření

Vzorek je umístěn do měrné cely a například čisté disperzní prostředí do cely referenční, zvukové vlny prochází oběma celami současně. Měření je tedy v ultrazvukovém spektrometru prováděno jako komparativní [57].

Analýza vzorku ultrazvukovou spektroskopií je založena na měření rychlosti průchodu ultrazvukové vlny vzorkem a změně její amplitudy. Ze změny charakteristik ultrazvukových vln jsou následně usuzovány vlastnosti měřeného vzorku [58].

Zvuková vlna procházející vzorkem, podobně jako vlna mechanická, testuje intermolekulární síly vzorku opakovanou kompresí a dekompresí při svém průchodu vzorkem [59]. Protože je velikost komprese a dekomprese způsobená zvukovou vlnou velmi malá, jedná se o nedestruktivní techniku [60].

Hustota a elasticita největší měrou ovlivňují rychlost, se kterou se zvuková vlna šíří vzorkem [60]. Vzhledem k tomu, že elasticita je velmi citlivá na intermolekulární uspořádání vzorku, je důležitějším znakem v porovnání s hustotou. Obecně platí, že nejnižší rychlost průchodu zvukové vlny mají plyny [59]. Nejvyšší rychlost šíření je dosaženo v pevných látkách, neboť mají nejsilnější interakce mezi molekulami. Rychlost šíření ultrazvukové vlny je velmi citlivá na molekulární uspořádání a mezimolekulové interakce [59, 61].

Zvuková vlna procházející vzorkem ztrácí část své energie tím, že ve vzorku způsobuje kompresi a dekompresi. Ztráta energie se promítne do snížení amplitudy zvukové vlny. Ultrazvukové zeslabení potom kvantifikuje míru ztráty této energie [58].

Platí, že velikost zeslabení zvukové vlny, na rozdíl od rychlosti propagace zvukové vlny vzorkem, není závislá na teplotě [62].

2.3.2 Využití HR-US v praxi

Mezi typické příklady využití ultrazvukové spektroskopie patří, agregace v suspenzích a emulzích [62], analýza vazby biopolymer-ligand, změna konformace biopolymerů [58], tvorba micel [59] a mnoho dalších procesů včetně analýzy suspenzí a emulzí [62].

Během měření vlastností roztoků hyaluronanu bylo zjištěno, že velikost relativní ultrazvukové rychlosti nezáleží na molekulové hmotnosti hyaluronanu, ale pouze na koncentraci dimerů D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu, které se nacházejí ve vzorku [63].

Pomocí ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením bylo prováděno i zkoumání interakcí mezi hyaluronanem a kladně nabitými povrchově aktivními látkami (CTAB, TTAB) [31]. Díky citlivosti ultrazvukového spektrometru bylo ve vodném prostředí odhaleno až 6 různých druhů komplexů hyaluronan-tenzid.

Je důležité si ovšem uvědomit, že ultrazvuková spektroskopie je metoda nepřímá, a jak je interpretována příčina změny ve velikosti ultrazvukové rychlosti nebo zeslabení zvukové vlny, je především otázkou znalostí problematiky a zkušeností s touto technikou [57].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

- NANO ITC 2G, cela 990 µl, syringe TA instruments 250 µl, TA instruments, USA
- MicroCal PEAQ-ITC (200 µl cela, 40 µl syringe), Malvern Panalytical Ltd, USA
- HR-US 102T, Ultrasonic Scientific, Irsko
- pH metr Metrohm, titrační modul 888 Titrando, kombinovaná pH-elektroda Metrohm, 6.0262.100, vnitřní elektrolyt 3 M KCl.

3.2 STANDARDNÍ PŘÍPRAVA VZORKŮ

3.2.1 Použité chemikálie

Hyaluronan sodný: Contipro Biotech s.r.o. (Česká republika), použité šarže jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 1).

Tabulka 1: Hyaluronan sodný použitý pro experimenty

Hyaluronan sodný			
Mw (kDa)	Šarže	Vlhkost	Mw* (kDa)
8–15	213-6147	11 %	9
15–30	213-6481	9 %	16
80–130	260315-E2	10 %	109
130–300	213-6213	10 %	137
250–450	120218-E1	5 %	310
600–800	210615-A-D2	6 %	680
1 400–1 600	181214-4-D1	9 %	1 540

M_w (*) je molekulová hmotnost získaná analýzou HPLC/SEC-MALS u výrobce.

Použité argininové oligomery v hydrochloridové formě byly získány v případě dimeru, tetrameru a oktameru od společnosti Vidia s.r.o. Dekamer a dodekamer argininu spolu s cecropinem B byly objednány od společnosti Chempeptide limited. Všechny zmíněné oligomery měly čistotu vyšší než 95%. Triakontamer argininu byl objednán od společnosti Alamanda polymers (čistota 90–100%). Bližší informace k použitým chemikáliím je možné najít v dizertační práci v tabulkách 2, 6, 7, 22 a 23.

3.2.2 Příprava roztoků hyaluronanu

Hyaluronan o různých molekulových hmotnostech byl připravován navažováním přesného množství hyaluronanu a rozpouštědla (ultračistá deionizovaná voda z přístroje PURELAB, PBS nebo roztokem o vhodné koncentraci NaCl). Všechny komponenty roztoků, tedy hyaluronan i rozpouštědlo byly během přípravy váženy. Vlhkost hyaluronanu byla započítána do navážky. Roztoky byly před měřením ponechány 24 h v uzavřené nádobě míchat při laboratorní teplotě. Pokud vzorky

nebylo možné použít ihned, byly uchovávány v chladničce při teplotě do 5 °C v uzavřených nádobách po dobu maximálně jednoho týdne z důvodu zamezení možné degradace hyaluronanu v roztoku [14]. Koncentrace byla stanovena na 0,1 %hm pro všechny experimenty. Tato koncentrace po přepočtu s využitím rovnice z práce Kargerové [63] odpovídá přibližně při úplné disociaci karboxylových skupin hyaluronanu koncentraci záporného náboje přibližně 2,5 mM pro všechna prostředí.

3.2.3 Příprava roztoků (poly)aminokyselin

Roztoky aminokyselin v monomerní podobě (Arg, Lys) a jejich monohydrochloridové formě byly připravovány v odměrných baňkách přímým rozpouštěním dané aminokyseliny (pomocí ultračisté deionizované vody z přístroje PURELAB) tak, aby výsledná koncentrace aminokyseliny v roztoku byla 25 mM. Pokud uvažujeme existenci jednoho kladného náboje na každé molekule aminokyseliny, jedná se o desetinásobně vyšší koncentraci kladných nábojů v porovnání se zápornými náboji v používaných roztocích hyaluronanu. Při měření vlastností s využitím ultrazvukového spektrometru byla koncentrace použitých roztoků aminokyselin stanovena na 41,5 mM, tak aby byl zajištěn přebytek aminokyseliny v roztoku v průběhu titrace.

Roztoky aminokyselin obsahující hyaluronan pro potenciometrické titrace s měřením pH byly připravovány z již připraveného roztoku aminokyseliny (včetně hydrochloridových forem). Poté byl navážen hyaluronan o požadované hmotnosti a doplněn roztokem aminokyseliny tak, aby vznikl roztok o koncentraci hyaluronanu 0,1 %hm. Všechny komponenty byly váženy. Roztok byl poté ponechán v uzavřené nádobě 24 h míchat na magnetické míchače.

Roztoky oligomerních argininů v hydrochloridové formě byly připravovány na výchozí koncentraci kladných nábojů 30 mM. Předpokladem byl jeden kladný náboj na monomerní jednotce (dimer tedy dva kladné náboje na molekule, tetramer 4 atd.). V případě roztoků s vyšší iontovou silou byly použity namísto vody předem připravené roztoky chloridu sodného nebo PBS. Koncentrace kladných nábojů 30 mM byla zvolena tak, aby přibližně v polovině titrace na ITC bylo dosaženo rovnosti kladných a záporných nábojů v roztoku.

Úprava pH roztoků oligomerů argininu

Protože některé oligomery aminokyselin měly pH svých zásobních roztoků nižší, než je hodnota disociační konstanty hyaluronanu (2,9–4,0 [6, 7]), bylo potřeba upravit pH těchto roztoků. Pro úpravu těchto roztoků oligomerů aminokyselin byl použit roztok 2 M NaOH. pH bylo upravováno u dimeru, tetrameru a oktameru argininu. Hydroxid sodný byl přidáván k roztoku oligomeru argininu za stálého míchání a měření pH až do dosažení hodnoty pH roztoku přibližně 6, tak aby se pH roztoku dostalo nad disociační konstantu hyaluronanu a pH bylo podobné ostatním oligomerům argininu. Výsledné hodnoty pH a množství přidaného roztoku hydroxidu ukazuje tabulka.

Díky neutralizaci přebytečné HCl za použití NaOH v roztoku dochází k tvorbě NaCl a tedy zvýšení iontové síly roztoku. Pokud budeme uvažovat přeměnu veškerého přidaného NaOH na NaCl, získáme koncentrace NaCl, které jsou uvedené v tabulce (Tabulka 2). Koncentrace soli v průběhu titrace narůstá a na konci titrace dosahuje maximální hodnoty přibližně 8 mM, což, jak bylo dokázáno v experimentech se zvýšenou iontovou silou, nemá na interakce pozorovatelný efekt.

Tabulka 2: Úprava pH roztoků oligomerů argininu

Oligomer	Výchozí objem (ml)	Přidaný objem (μl)	pH po úpravě	Koncentrace NaCl (mM)
2 Arg·HCl	4,0	70	6,46	34,40
4 Arg·HCl	4,0	60	6,84	29,55
8 Arg·HCl	3,5	50	6,82	28,17

3.2.4 Příprava roztoků cecropinu B

Roztoky cecropinu B byly připravovány na výchozí koncentraci kladných nábojů 30 mM. Předpokladem byl jeden kladný náboj na aminokyselinovém zbytku argininu resp. lysinu přítomném ve struktuře antimikrobiálního peptidu (molekula cecropinu B obsahuje 2 kladné náboje na argininových zbytcích a 7 na lysinových), spolu s volnou primární aminoskupinou lysinu, která dodávala další kladný náboj, bylo ve struktuře antimikrobiálního peptidu, za fyziologického pH, přítomno celkem 10 kladných nábojů. K úpravě pH nebylo přistoupeno, neboť pH čistého roztoku antimikrobiálního peptidu se pohybovalo nad hodnotou disociační konstanty hyaluronanu [6, 7].

V případě přípravy roztoků cecropinu B v prostředí PBS byl postup shodný, pouze byl místo ultračisté vody použit právě PBS vyráběný komerčně.

3.2.5 Molární poměr

Molární poměr byl počítán jako poměr počtu disacharidových jednotek hyaluronanu a argininových monomerních jednotek přítomných v roztoku. Molekulová hmotnost hyaluronanové disacharidové jednotky byla uvažována jako 401,229 g/mol a molekulové hmotnosti hyaluronanu byly převzaty z SEC-MALS analýzy prováděné výrobcem. Pokud uvažujeme přítomnost jednoho kladného náboje na monomeru oligomeru argininu a jednoho záporného náboje na disacharidové jednotce hyaluronanu při jeho plné disociaci, dává molární poměr zároveň poměr pozitivních a negativních nábojů v roztoku. Molární poměr jinými slovy označuje poměr nábojů na hyaluronanu k nábojům na argininu.

3.2.6 Zpracování dat HR-US

Vyhodnocování dat bylo v případě ultrazvukového spektrometru prováděno v několika krocích. V této kapitole je obecně popsán postup vyhodnocování dat relativní rychlosti v systému roztoku oligomeru argininu spolu s roztokem hyaluronanu. Referenční cela byla v průběhu všech měření naplněna vodou. Všechna měření byla prováděna při 25 °C, v čisté vodě, PBS nebo prostředích

s různou koncentrací NaCl. K analýze dat byl využit software Titration Analyzer (Ultrasonic Scientific, Irsko).

Nejprve došlo k naměření samotné titrace. Hodnoty z jednotlivých opakování se zprůměrovaly.

Na základě opakovaných titrací vody do roztoku hyaluronanu bylo zjištěno, že molekulová hmotnost hyaluronanu nemá vliv na ředění hyaluronanu. Proto bylo možné stanovit jednu univerzálně platnou závislost pro dané prostředí (vodné roztoky, PBS, zvýšenou iontovou sílu), která byla odečítána jako vliv ředění hyaluronanu. Relativní rychlost byla v tomto případě vztažena na počet jednotlivých přídavek vody do systému.

Kromě ředění hyaluronanu byl odečítán i vliv ředění samotného oligomeru argininu.

Stejným způsobem byla zpracována data i pro ostatní systémy a prostředí, včetně dat zeslabení zvukových vln. V následujících kapitolách, jsou zobrazené výsledky z HR-US vždy zpracované stejným způsobem.

3.2.7 Zpracování dat ITC

Tepelné efekty z titrací roztoku titrantu do měrné cely byly ve většině případů měřeny pomocí MicroCal PEAQ-ITC (Malvern Panalytical Ltd, USA), menší část experimentů byla provedena na přístroji Nano ITC 2G (TA Instruments, USA). Titrace vody do vody byla provedena před každým experimentem, aby se zajistilo, že zařízení měří správně. Každé měření bylo provedeno alespoň třikrát, v práci jsou v grafech a tabulkách uváděny průměrné hodnoty spolu s odpovídajícími směrodatnými odchylkami v tabulkách a chybovými úsečkami v grafech. Referenční cela byla v průběhu všech měření naplněna vodou. Všechna měření byla prováděna při 25 °C, v čisté vodě, PBS nebo prostředích s různou koncentrací NaCl.

K integraci píků a vyhodnocení dat získaných z měření byly využity programy MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software (Malvern Panalytical Ltd.) a NanoAnalyze (TA instruments, USA), dodávané k oběma přístrojům. Oba programy využívají standardní procedury [64] k získání základních termodynamických parametrů, které jsou zde nazývány standardní interakční Gibbsova energie (ΔG°), standardní interakční entalpie (nebo také entalpický příspěvek; ΔH°) a standardní entropie (ΔS°) jako produkt $T\Delta S^\circ$ je nazývána entropickým příspěvkem. Programy také podávají informaci o rovnovážné konstantě, obvykle nazývané disociační konstanta (K_D). Tato terminologie je zachována i v této práci.

Při zkoumání interakcí mezi oligomery argininu a hyaluronanem byl roztok hyaluronanu o koncentraci 0,1 %hm umístěn vždy v cele a roztok oligomeru argininu sehrál roli titrantu. Pro zjištění rozpouštěcích tepel byly prováděny titrace oligomeru argininu do vody nebo příslušeného prostředí. Ředící tepla byla odečítána od tepel titrace na počátku vyhodnocení. Ředící teplo hyaluronanu nebylo bráno v úvahu, neboť je dle dostupné literatury [65–67] v porovnání s teplem uvolněným v průběhu titrace velmi malé a zanedbatelné.

4 VÝZNAMNÉ VÝSLEDKY A DISKUSE

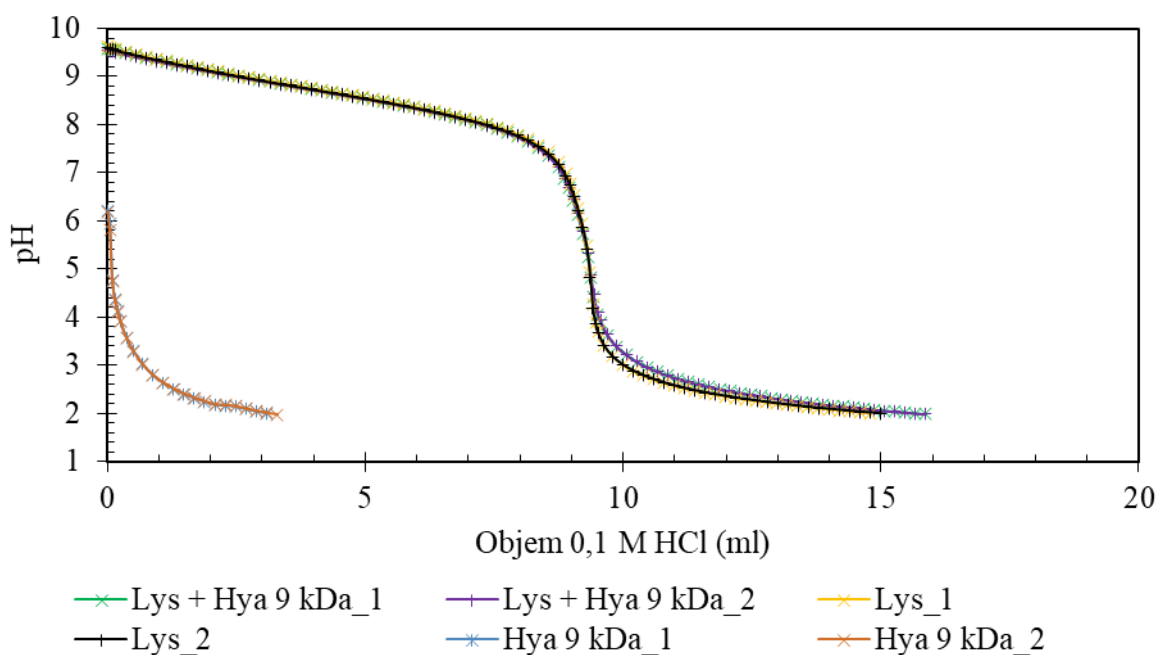
4.1 POTENCIOMETRICKÉ TITRACE

Cílem těchto titrací bylo prozkoumat (elektrostatické) interakce mezi hyaluronanem a jednoduchými aminokyselinami (Arg, Lys). Na automatickém titrátoru byla přidávána kyselina chlorovodíková do roztoků hyaluronanu nebo aminokyseliny (včetně monohydrochloridové formy), a do roztoků obsahujících obě chemikálie. Během titrace bylo pomocí kombinované elektrody zaznamenáváno pH. Titrace byly prováděny pouze ve vodném prostředí. Pokud by hyaluronan interagoval s aminokyselinou, pravděpodobně by nebyl schopný „přijímat“ protony od titrující kyseliny chlorovodíkové a pH by strmě klesalo. Na druhou stranu by je mohl přijímat karboxyl aminokyseliny, který do agregace pravděpodobně není zaangażován, proto se titrovaly roztoky čistého hyaluronanu i aminokyselin.

4.1.1 Výsledky

Reprezentativní příklad získaných dat je uveden v grafu na obrázku (Obrázek 1). Na první pohled se výsledky monohydrochloridových forem aminokyselin a čistých aminokyselin zdály rozdílné, při bližší analýze však bylo zjištěno, že monohydrochloridová forma aminokyselin poskytovala polovinu sigmoidní křivky čisté aminokyseliny.

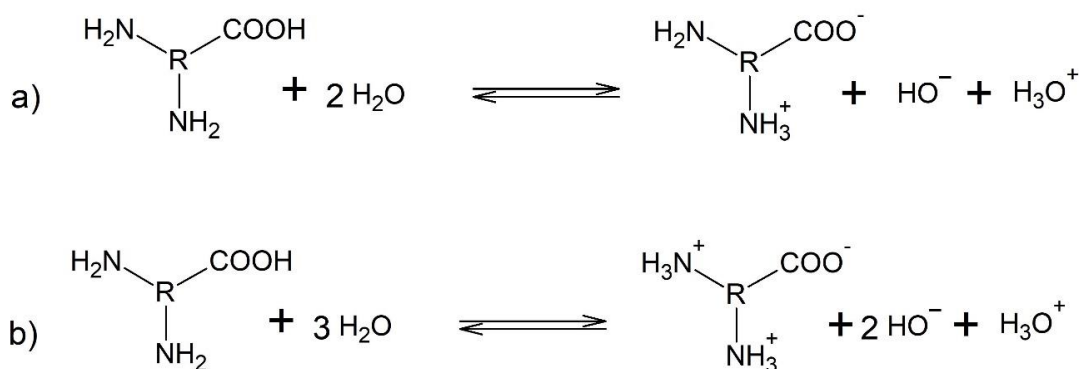
Ve všech změřených kombinacích hyaluronanu s aminokyselinami bylo možné si povšimnout ve spodní polovině sigmoidní křivky drobného rozdílu v hodnotě pH mezi roztoky aminokyselin a aminokyselin s hyaluronanem u stejného přidaného objemu HCl. Na rozdíl od předchozích výsledků [33] byl však tento rozdíl opačný. Při stejném objemu přidané 0,1 M kyseliny chlorovodíkové bylo pH nižší u roztoků samotných aminokyselin než u roztoků aminokyselin s hyaluronanem.



Obrázek 1: Graf znázorňující změnu pH při titracích roztoků Lys spolu s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 9 kDa roztokem 0,1 M HCl.

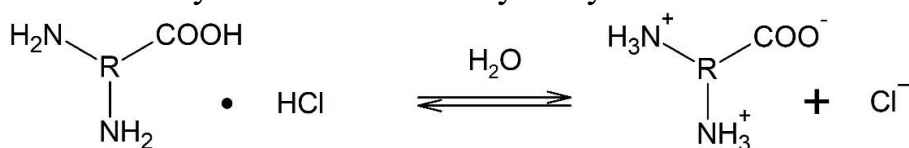
4.1.2 Diskuse

Pokud bychom se detailněji podívali na titrační křivku, objevili bychom několik dějů, které v ní probíhají. Jako příklad do diskuse byl zvolen lysin, nicméně popsané procesy probíhají u obou studovaných aminokyselin. Titrační křivka lysinu samotného začínala přibližně na hodnotě pH 9,5, tedy mírně pod oblastí jeho izoelektrického bodu ($pI = 10,0$). Důvodem, proč mělo pH roztoku aminokyseliny ve vodě zásaditý charakter a nikoliv neutrální, jak se původně předpokládalo, byla pravděpodobně disociace $\varepsilon\text{-NH}_2$ skupiny na postranním řetězci, která při rozpouštění ve vodě na části molekul také disociovala, což vychýlilo pH z neutrální pozice, jak ukazuje schéma na obrázku (Obrázek 2), rovnice b). Nicméně v roztoku byly zastoupeny oba produkty hydratace, neboť se hodnota pH pohybovala velmi blízko oblasti izoelektrického bodu, kde se molekula aminokyseliny jeví jako elektroneutrální. Toto uspořádání ilustruje schéma na obrázku (Obrázek 2), rovnice a).



Obrázek 2: Schematicky znázorněná disociace lysinu ve vodě.

V případě monohydrochloridových forem aminokyselin by titrace roztoku aminokyseliny měly začínat přibližně v oblasti neutrálního pH (Obrázek 3). Důvodem, proč titrace monohydrochloridových forem aminokyselin začínaly za nižšího pH než neutrálního (přibližně 5,5), mohl být vyšší než stechiometrický obsah kyseliny chlorovodíkové. Ze schématu na obrázku (Obrázek 3) je zároveň patrné, proč měla monohydrochloridová forma zdánlivě odlišnou titrační křivku. Je tomu proto, že monohydrochloridová forma přeskočila nabíjení zbylé části nenabitých ϵ aminoskupin na aminokyselině v průběhu titrace chlorovodíkovou kyselinou a vstoupila do roztoku jako plně disociovaná. Proto titrační křivka neměla klasický sigmoidní tvar (Obrázek 1), ale kopírovala svým tvarem pouze spodní polovinu křivky standardní aminokyseliny.



Obrázek 3: Schematicky znázorněná disociace lysinu monohydrochloridu ve vodě.

Titrace tedy začínala přibližně v oblasti směsi amfoterního iontu a zcela nabitě aminokyseliny, kde přidavkem kyseliny chlorovodíkové docházelo postupně k úplné přeměně na zcela nabitou formu s převahou kladného náboje. Vyšší pH ve spodní části křivky v případě roztoků hyaluronanu s aminokyselinou v porovnání se samotným roztokem aminokyseliny bylo pravděpodobně způsobeno tím, že kromě spotřeby protonů na protonizaci aminokyseliny bylo potřeba ještě uvážit přítomnost karboxylových skupin hyaluronanu. Ty byly přítomné jako sodná sůl karboxylové kyseliny. Hyaluronan je slabá kyselina s pK_a v rozsahu 2,9–4 [6, 7]. Drobný rozdíl mezi jednotlivými titračními křivkami nastával právě od pH 4. Hyaluronan tedy spotřebovával další protony z roztoku a vytvářel neprotonizovanou formu a chlorid sodný. Díky této reakci zůstávalo pH roztoku při stejném přidavku kyseliny chlorovodíkové vyšší v porovnání se samotným roztokem aminokyseliny. Tato změna zároveň znamenala, že interakce mezi hyaluronanem a aminokyselinami pravděpodobně neprobíhaly. Pokud by byl hyaluronan vázaný na aminokyselinu, k rozdílu mezi titračními křivkami by pravděpodobně nenacházelo, neboť by byla disociovaná karboxylová skupina hyaluronanu zablokována v interakci s aminokyselinou a tedy nepřístupná pro přijetí protonu z roztoku.

Díky ztrátě náboje na hyaluronanu byla interakce mezi hyaluronanem a aminokyselinou při pH nižším než 4 nepravděpodobná.

Toto vysvětlení bylo platné pro arginin i lysin nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu.

Získané výsledky nepodpořily teorie [33, 68] o prokázání přítomnosti interakcí mezi hyaluronanem a aminokyselinou pomocí titrace kyseliny chlorovodíkové do roztoku a měření jeho pH.

4.2 INTERAKCE HYALURONAN-ARGININ STUDOVANÉ POMOCÍ HR-US A ITC

V rámci této kapitoly byl zkoumán vliv molekulové hmotnosti oligomeru argininu a hyaluronanu na vzájemné interakce s využitím technik ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením a izotermické titrační kalorimetrie v prostředí vody, PBS a prostředích o různých iontových silách. Cílem bylo charakterizovat interakce mezi polymery.

4.2.1 Výsledky

Základní informace o systémech obsahující oligomerní arginin a hyaluronan byly získány pomocí jednoduchého vizuálního pozorování. Pro tato pozorování byly zpravidla vybrány molekulové hmotnosti hyaluronanu 9 a 1 540 kDa. Výsledky všech vizuálních pozorování jsou shrnuty v tabulkách v příloze (Tabulka P 1, Tabulka P 2, Tabulka P 3). Žádné změny nebyly zaznamenány pro monomer, dimer a tetramer argininu hydrochloridu a roztoku zůstaly čiré po celou dobu titrace. V případě vyšších oligomerů argininu se systém mění z čirého k mléčnému až k zakalenému v případě 9 kDa hyaluronanu. U 1 540 kDa hyaluronanu dochází dokonce k makroskopické separaci (precipitaci). K těmto změnám dochází ve vodě zpravidla kolem molárního poměru 1. Pokud jsou v roztoku přítomny další ionty, tyto změny se obvykle odehrávají za vyšších molárních poměrů. Tento posun je dobře patrný zejména v případě PBS.

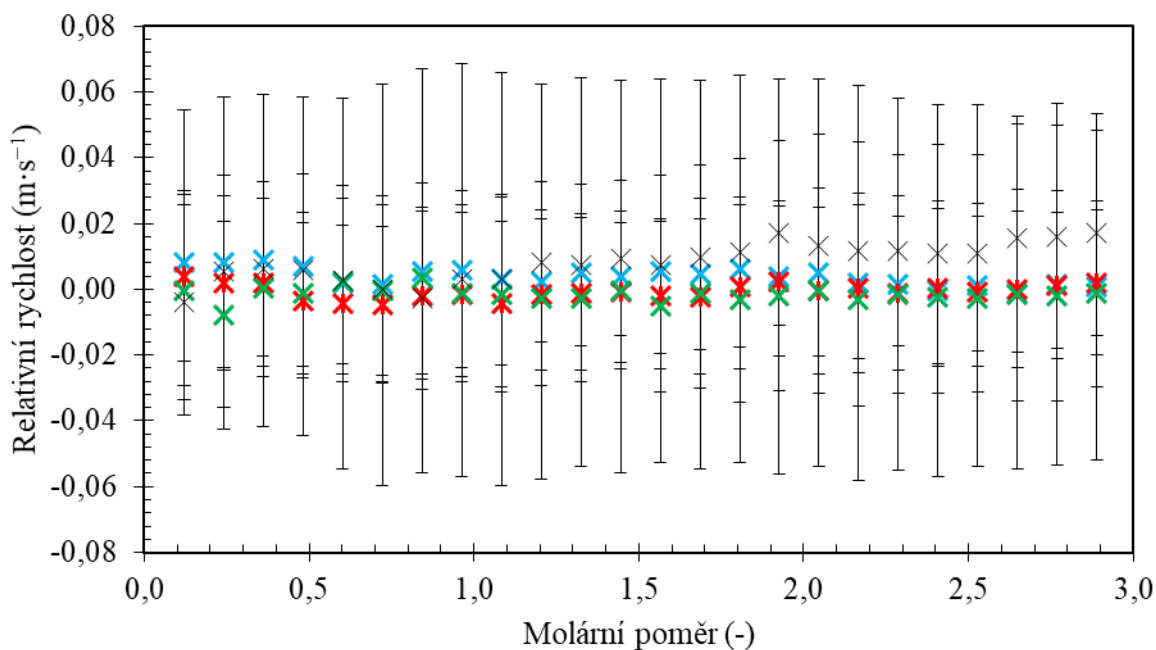
Výsledky z HR-US

Monomerní a oligomerní arginin až do tetrameru vykázal v průběhu titrace v prostředí vody téměř neměnnou relativní rychlost a zeslabení v celé se vzorkem, jak ukazuje graf na obrázku (Obrázek 4). To ukázalo na nepřítomnost interakcí z pohledu ultrazvukového vlnění. Zeslabení ultrazvukových vln bylo nutné, s ohledem na velkou chybu stanovení, posuzovat spíše jako podpůrný výsledek měření relativní rychlosti.

pH roztoků dimeru a tetrameru argininu muselo být upraveno na neutrální hodnoty. Tyto úpravy však ani u jednoho z oligomerů nevyústily ve změněný záznam relativní rychlosti ultrazvukových vln (Obrázek 4). Zkoumány byly pouze interakce s vysokomolekulárním hyaluronanem, neboť zde byl vyšší předpoklad pozorování interakcí.

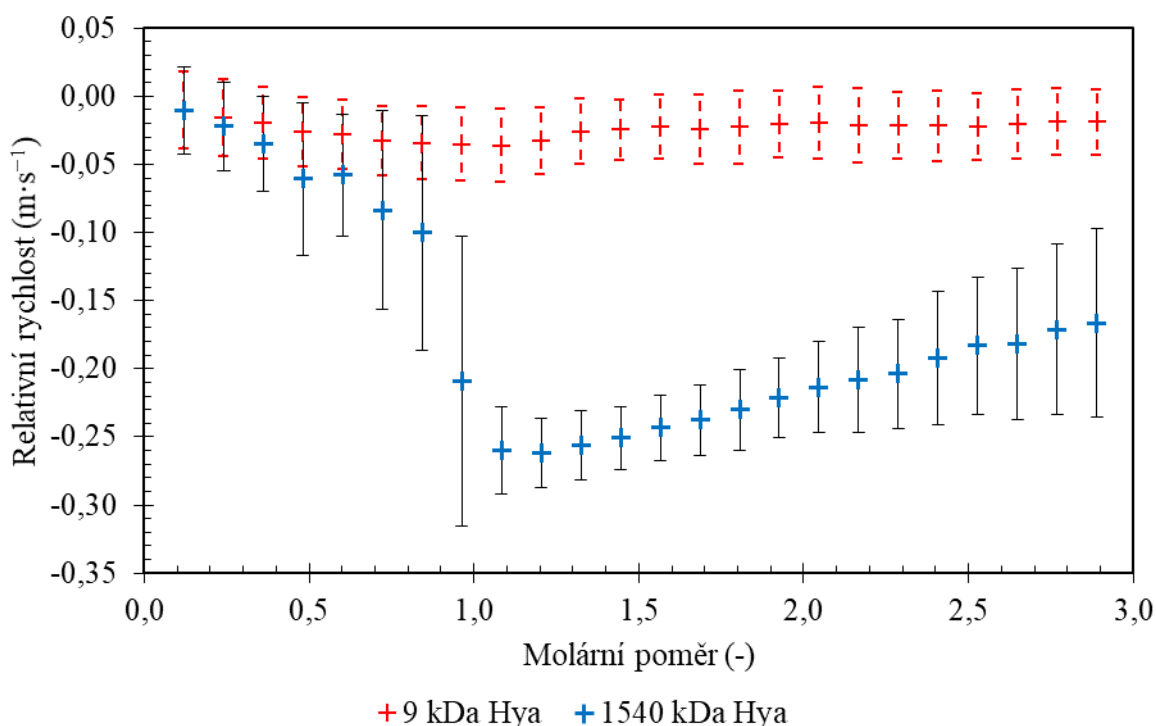
Situace se změnila v případě oktameru argininu ve vodě. Vizuální pozorování ukázala, že na rozdíl od kratších oligomerů argininu byl oktamer argininu schopen v průběhu titrace vytvořit zakalený roztok, respektive zakalený roztok se sraženinami, v závislosti na použité molekulové hmotnosti hyaluronanu (Tabulka P 1). V případě roztoků oktameru argininu s upraveným pH byla vizuální změna velmi dobře patrná i u nízkomolekulárního hyaluronanu. Na rozdíl od kratších oligomerů argininu došlo k poklesu relativní rychlosti v průběhu titrace díky uvolnění hydratační vody z hydratačního obalu. Tento rozdíl byl velmi dobře pozorovatelný u vysokomolekulárního hyaluronanu, jak ukazují data v grafu na obrázku (Obrázek

5). Pokles se zastavil kolem molárního poměru 1, to znamená kolem předpokládaného bodu nábojové ekvivalence, poté relativní rychlost mírně narůstá. Úprava pH roztoků argininu neměla za následek výrazné změny v titračním profilu, došlo k výraznějšímu poklesu relativní rychlosti v případě nízkomolekulárního hyaluronanu. U obou molekulových hmotností hyaluronanu pak nedocházelo k opětovnému nárůstu relativní rychlosti a místo minima byla v obou případech pozorovaná sigmoidní závislost s inflexním bodem kolem molárního poměru 1,7–1,9.



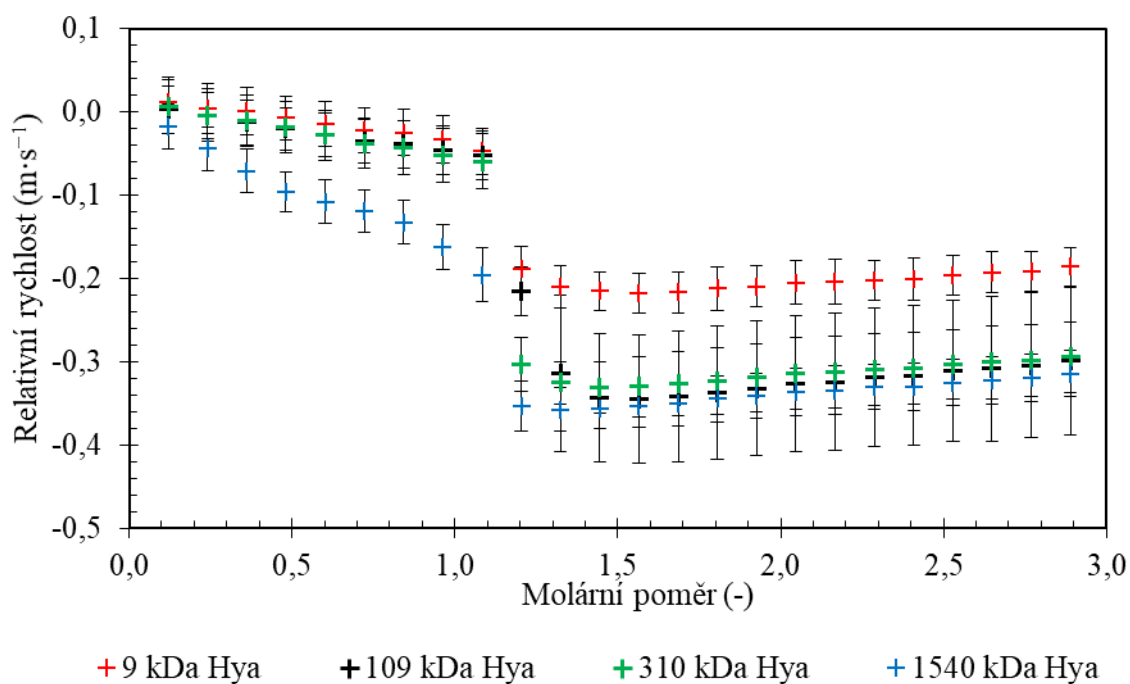
× 2 Arg.HCl × 4 Arg.HCl × 2 Arg.HCl upravené pH × 4 Arg.HCl upravené pH

Obrázek 4: Závislost relativní rychlosti na molárním poměru při titraci dimeru a tetrameru argininu včetně roztoků s upraveným pH do roztoku hyaluronanu 1 540 kDa ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)



Obrázek 5: Závislost relativní rychlosti na molárním poměru při titraci oktameru argininu do roztoku hyaluronanu o molekulových hmotnostech 9 a 1 540 kDa ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)

Výsledky u delších oligomerů argininu (10, 12 a 30) si byly vzájemně podobné. V případě dekameru a dodekameru byl také detailněji studován vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu na interakce. Relativní rychlost v průběhu titrace nejprve téměř lineárně klesá až k molárnímu poměru 1. Pak nastává prudký pokles následovaný mírným nárůstem (dekamer, dodekamer) nebo konstantními hodnotami relativní rychlosti (triakontamer). Hyaluronan s nejvyšší molekulovou hmotností (1 540 kDa) měl nejvyšší sklon v počáteční fázi titrace, zatímco ostatní molekulové hmotnosti nejsou vzájemně rozlišitelné. Naopak hyaluronan s nejnižší molekulovou hmotností (9 kDa) měl v průběhu titrace nejmenší pokles v relativní rychlosti. Nejmenší rozdíl mezi vysokomolekulárním (1 540 kDa) a nízkomolekulárním (9 kDa) hyaluronanem byl pozorován v případě triakontameru argininu. Jako ilustrační příklad byl zvolen dekamer (Obrázek 6).

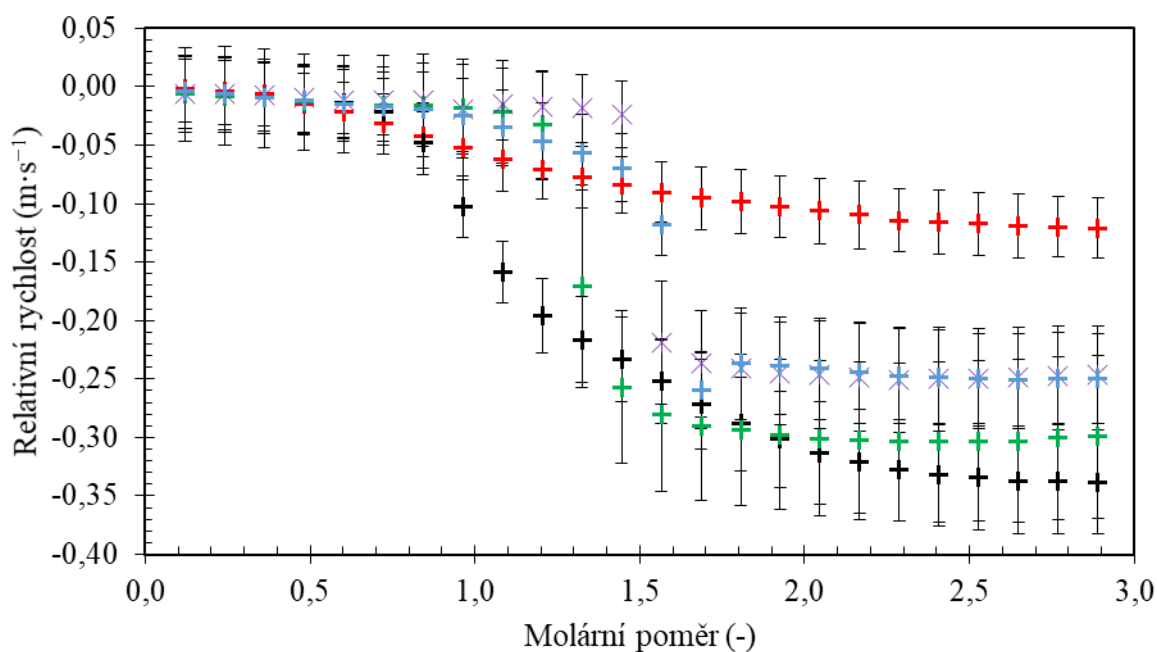


Obrázek 6: Závislost relativní rychlosti na molárním poměru při titraci dekameru argininu do roztoku hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)

Vliv prostředí

Pro tyto experimenty byly zvoleny oligomery argininu, tedy dekamer, dodekamer a triakontamer, s ohledem na výsledky měření ve vodě, neboť prokázaly interakce se všemi studovanými molekulovými hmotnostmi hyaluronanu. Vliv iontů a iontové řízeného pH byl studován přípravou roztoků v PBS nebo v roztocích NaCl s různou koncentrací soli.

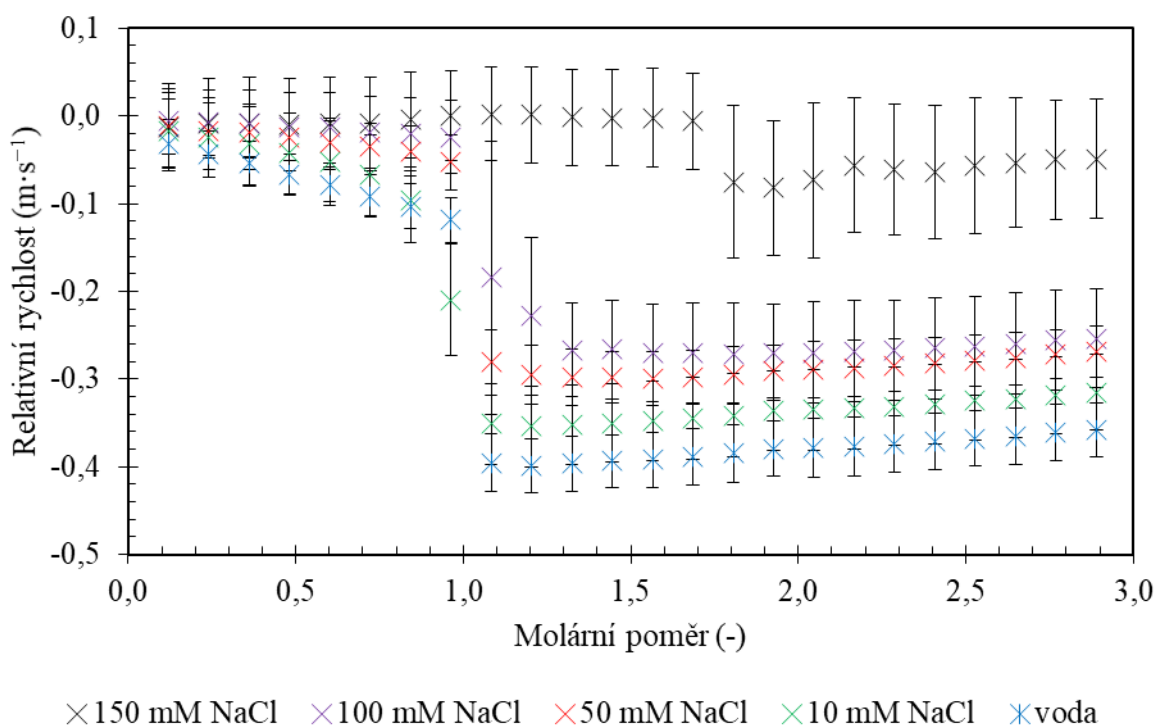
Efekt PBS byl studován na triakontameru argininu (Obrázek 7). Arginin dodekamer a dekamer byly v prostředí PBS testovány pouze za použití ITC. Byly zkoumány vybrané molekulové hmotnosti hyaluronanu v rozsahu 9–1 540 kDa. Během prvních přídavek byly hodnoty relativních rychlostí konstantní a k interakcím během těchto přídavek pravděpodobně nedocházelo. Poté následoval rychlý pokles relativní rychlosti jako u titrací ve vodě. Výjimku tvořil 9 kDa hyaluronan, kde byl pokles relativní rychlosti mírnější a pozvolnější. Pokles v případě 109 kDa nebyl tak strmý jako pro zbývající molekulové hmotnosti a rozkládal se na poměrně širokém intervalu molárního poměru. Molární poměr, ve kterém se skokově mění relativní rychlost, byl obecně posunut do vyšších hodnot ve srovnání s vodným prostředím, nicméně vliv PBS na interakce byl do značné míry závislý na molekulové hmotnosti hyaluronanu.



+ 9 kDa Hya + 109 kDa Hya + 310 kDa Hya x 680 kDa Hya + 1540 kDa Hya

Obrázek 7: Závislost relativní rychlosti na molárním poměru při titraci triakontameru argininu do roztoku hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech v prostředí PBS. (11,6 MHz, 25 °C)

Efekt rostoucí koncentrace chloridu sodného (iontové síly) byl studován s využitím dodekameru argininu. Použita byla jedna molekulová hmotnost hyaluronanu 680 kDa. Jak ukazuje graf na obrázku (Obrázek 8), s rostoucí iontovou silou docházelo k postupnému zmenšení skokového poklesu relativní rychlosti. Sklon relativní rychlosti během počátečních přidavků s rostoucí iontovou silou také nebyl tak strmý a u dvou nejvyšších koncentrací NaCl byl téměř nulový. V případě nejvyšší iontové síly byl zjištěn pouze velmi malý pokles v parametru relativní rychlosti.



Obrázek 8: Závislost relativní rychlosti na molárním poměru při titraci dodekameru argininu do roztoku hyaluronanu o molekulové hmotnosti 680 kDa v prostředích o různých iontových silách. (11,6 MHz, 25 °C)

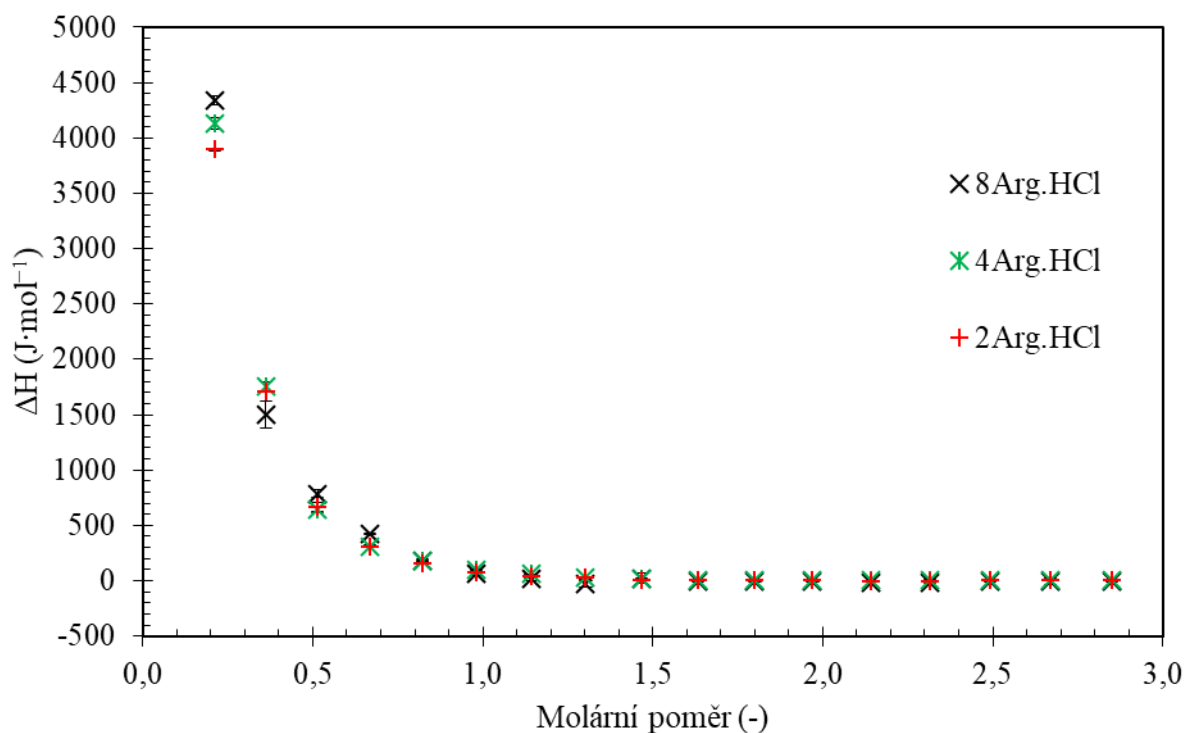
Výsledky z ITC

Metoda izotermické titrační kalorimetrie umožnila získání základních termodynamických parametrů interakcí mezi hyaluronanem a oligomery argininu. Po odečtení rozpouštěcích tepel od titrací, byly všechny interakce endotermického charakteru. Byly pozorovány tři druhy titračních křivek (závislosti změny entalpie na molárním poměru v průběhu titrace). Kromě sigmoidního tvaru, který je typický pro systémy s vysycením interakce v průběhu titrace, byly pozorovány také prostý pokles a křivky dvou typů vazných míst.

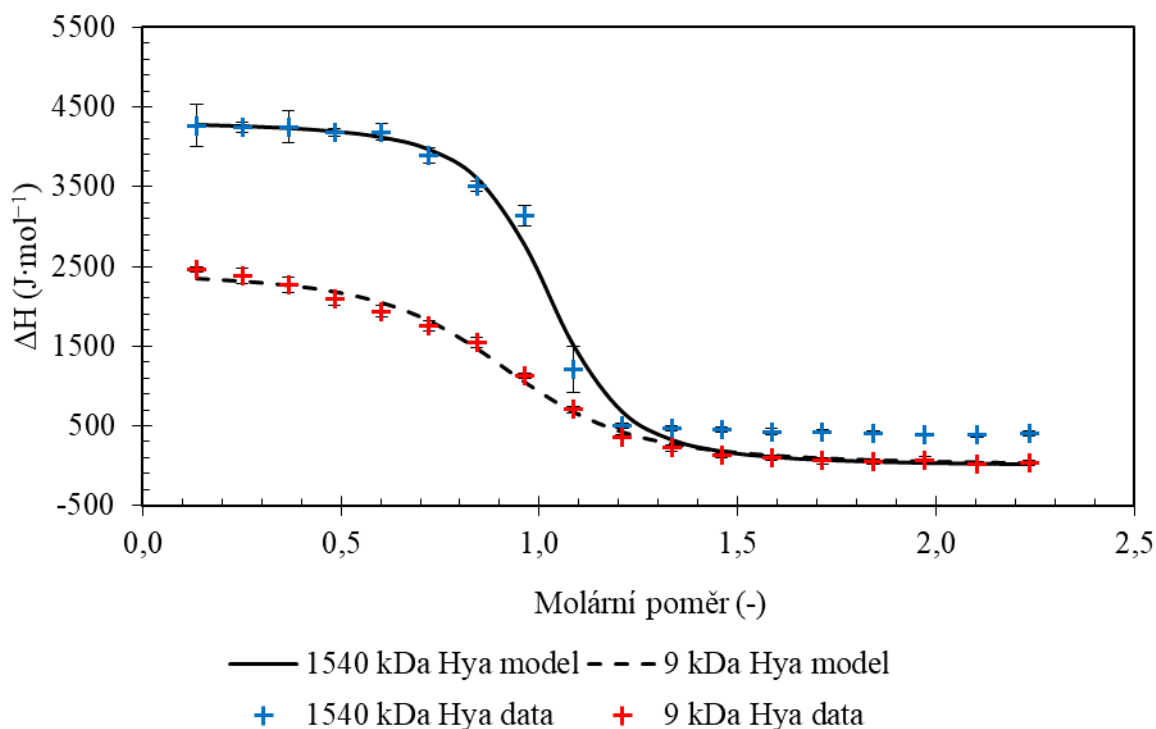
Pro nejkratší oligomery argininu (včetně oktameru), nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu, nebyl pozorován typický sigmoidní tvar. Jak ukazuje graf na obrázku (Obrázek 9), u všech závislostí docházelo k prudkému poklesu tepla přibližně do molárního poměru 1, s rostoucím molárním poměrem nebyly další tepelné efekty pozorovány. ITC nereflektovala vizuální pozorování, kde docházelo v případě oktameru až k tvorbě sraženiny kolem molárního poměru 1, a všechny systémy byly prakticky nerozlišitelné.

V případě dodekameru a tirakontameru argininu byl při interakcích s hyaluronanem získán typický sigmoidní tvar titračních křivek. Příklad je uveden v grafu na obrázku (Obrázek 10).

Tento tvar titrační křivky ukazoval na přítomnost interakcí mezi hyaluronanem a oligomerem argininu od prvního přídavku oligomeru, až do vyčerpání vazných míst na hyaluronanu v okolí nábojového poměru 1 u všech studovaných případů.



Obrázek 9: Graf zobrazující ITC záznamy různých argininových oligomerů ve formě hydrochloridu do roztoku 1 540 kDa hyaluronanu ve vodě (25 °C).

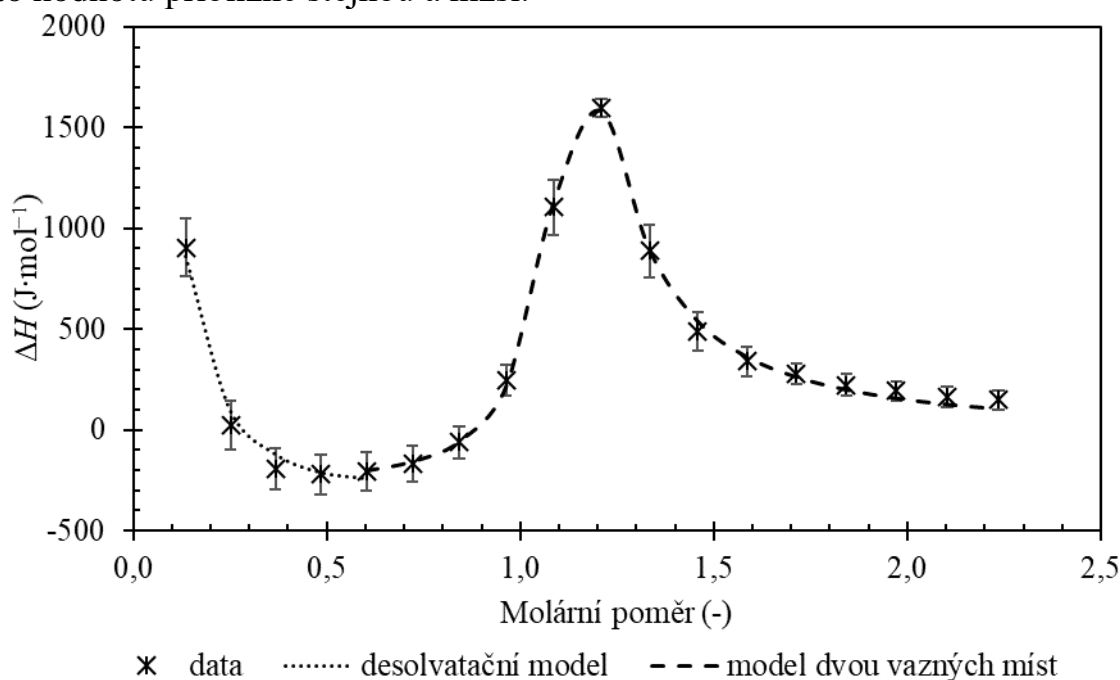


Obrázek 10: Graf zobrazující ITC záznamy titrací argininu dodekameru v hydrochloridové formě do roztoku 9 a 1 540 kDa hyaluronanu ve vodě (25 °C). Pro vyhodnocení dat byl použit model jednoho typu vazného místa.

Sigmoidní tvar byl pozorován rovněž v případě oktameru argininu s upraveným pH, při titraci do vysokomolekulárního hyaluronanu. V tomto případě byl inflexní bod posunut k vyššímu molárnímu poměru přibližně 1,5.

Dekamer argininu byl z hlediska ITC unikátní oligomer. Příklad jeho titrační izotermy je uveden na obrázku (Obrázek 11). Titrační izoterma neměla typický sigmoidní nebo pouze klesající tvar, který byl pozorovatelný u nejkratších oligomerů, ale její tvar byl typický pro přítomnost několika typů vazných míst [64, 69], v tomto případě se jevil jako lepší výraz interakčních událostí. Vyhodnocování se lišilo s molekulovou hmotností hyaluronanu. S rostoucí molekulovou hmotností hyaluronanu desolvatační část vymizela a zůstaly pouze dvě interakční události. Maximum v části dvou interakčních událostí bylo pozorováno stále za stejného molárního poměru, nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu.

Pro stanovení termodynamických parametrů byly titrace s typickým sigmoidním tvarem prokládány modelem jednoho typu vazného místa. Termodynamické parametry interakcí pro různé oligomery argininu se příliš nelišily a poměr standardních entalpických a standardních entropických příspěvků byl velmi podobný. Interakce mezi oligomerem argininu a hyaluronanem byly charakterizovány malou nepříznivou hodnotou standardní entalpie a byly hnané entropicky. Nejnižší molekulová hmotnost hyaluronanu měla nejvyšší hodnotu disociační konstanty, zatímco molekulové hmotnosti hyaluronanu nad 109 kDa měly tuto hodnotu přibližně stejnou a nižší.



Obrázek 11: Graf zobrazující ITC záznam titrací argininu dekameru v hydrochloridové formě do roztoku 9 kDa hyaluronanu ve vodě (25 °C). Model dvou typů vazných míst a desolvatační model byly použity pro vyhodnocení dat.

Vliv prostředí

Stejně jako v případě ultrazvukové spektroskopie byly pro experimenty se zvýšenou iontovou silou vybrány nejdelší oligomery argininu. Dodekamer a dekamer argininu v prostředí PBS (pH 7,4) nevykázaly žádné interakce nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu (nebylo zaznamenáno měřitelné teplo). V případě triakontameru argininu byl vždy pozorován sigmoidní tvar titrační křivky.

Molární poměr odpovídající vysycení vazných míst (inflexní bod na ITC křivce) se zvyšoval s rostoucí molekulovou hmotností hyaluronanu až k 1,5. Velikost standardní interakční entalpie byla o řád nižší v porovnání s roztoky připravenými pouze ve vodě. Stejně jako v případě vodných roztoků, byly interakce hnány standardním entropickým příspěvkem.

Protože arginin dodekamer nebyl schopen interagovat s hyaluronanem v PBS, byl tento oligomer vybrán pro testování efektu zvyšující se iontové síly. K testování byly určeny roztoky s koncentracemi 10, 50, 100 a 150 mM NaCl. Všechny titrace probíhaly s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 680 kDa a s výjimkou 150 mM NaCl vykázaly všechny vzorky sigmoidní titrační křivku. V případě 150 mM NaCl již interakce nebyly rozpoznatelné (nebylo zaznamenáno měřitelné teplo). Molární poměr odpovídající vysycení vazných míst zůstal kolem 1 a nedocházelo tedy k posunu pozorovanému v případě PBS roztoků. Velikost změny standardní interakční entalpie klesala s rostoucí iontovou silou, zatímco disociační konstanta zůstávala přibližně konstantní. Příspěvky v podobě změny standardní Gibbsovy energie a standardní entropie se zdály neovlivněné velikostí iontové síly. Z naměřených dat se tedy zdálo, že iontová síla neměla významný vliv na intenzitu interakcí, pokud nebyla dostatečně vysoká (koncentrace NaCl 150 mM).

Dekamer argininu, který vykázal velmi specifické chování zaznamenané pomocí ITC ve vodě, nevykázal žádné měřitelné interakce v prostředí PBS nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu. V prostředích 10 a 50 mM NaCl dekamer argininu interagoval s hyaluronanem o molekulových hmotnostech 9 a 1 540 kDa obdobně. Vytvářel zakalené systémy s nízkou molekulovou hmotností hyaluronanu a sraženiny s vysokomolekulárním hyaluronanem. Všechny vzorky s vysokou molekulovou hmotností ukázaly sigmoidní titrační křivku s ještě menší hodnotou standardní interakční entalpie než jaká byla naměřená v případě dodekameru argininu ve shodném prostředí. Vzorky s nízkomolekulárním hyaluronanem vykázaly naopak pouhý pokles, podobný kratším oligomerům argininu. Specifické chování dekameru argininu bylo potlačeno přítomností dalších iontů v roztoku.

4.2.2 Diskuse

V případě monomerního argininu a oligomerů argininu až po tetramer (včetně) nebyly pro roztoky připravené ve vodě pozorovány žádné interakce nezávisle na použité molekulové hmotnosti hyaluronanu. Nepřítomnost interakcí se nezměnila ani po úpravě pH. Pokud bychom vzali do úvahy výsledky vizuálního pozorování a ultrazvukové spektroskopie je možné, že tvar prostého poklesu zaznamenaného na ITC pro nejkratší oligomery (Obrázek 9) byl pravděpodobně způsoben směřovacím teplem nebo entalpií míšení, které se vytrácejí s rostoucí koncentrací směsi hyaluronan-arginin.

V případě dodekameru a triakontameru záznamy z ITC dobře korespondovaly s daty získanými pomocí HR-US. Prudký pokles na sigmoidní křivce korespondoval s náhlým poklesem relativní ultrazvukové rychlosti. Ultrazvuková rychlost však byla více senzitivní ke změnám odehrávajícím se v průběhu první části titrace, kde ITC

zaznamenala prakticky konstantní hodnoty měřené změny entalpie ΔH . Obě techniky pak ukázaly, že se interakce lišily při použití různých molekulových hmotností hyaluronanu.

Pokles v relativní rychlosti obvykle indikuje změnu v hydratačních obalech molekul. Protože je voda v hydratačním obalu méně stlačitelná v porovnání s objemovou vodou [70], je také hustší [71], což pomáhá v šíření zvukových vln [58], dochází k poklesu relativní rychlosti, pokud je voda z hydratačního obalu uvolňovaná. Delší oligomery argininu narušily hydratační obal hyaluronanu za tvorby asociátů se společným hydratačním obalem, který měl méně molekul hydratační vody v porovnání s množstvím molekul hydratační vody obsažené v obou obalech samostatně. Relativní rychlost klesala až do vysycení všech vazebných míst na hyaluronanu. Poté již k dalšímu uvolňování hydratační vody nedocházelo a relativní rychlost začala pouze mírně růst. Tento nárůst mohl být připsán zvyšujícímu se množství sodných a chloridových protiiontů z hyaluronanu a argininu nebo částečnému rozpouštění precipitátu v důsledku ředění. Bylo zajímavé, že se tyto interakce vysytily kolem molárního poměru 1, přesto, že by neměly být striktně elektrostatického původu. Změny v hydrataci se mohly odehrávat primárně na nabitých skupinách a byly indukovány pomocí elektrostrikčního efektu [72–75].

Klesající relativní ultrazvuková rychlost v první části titrace byla připsána hlavně změnám v hydrataci. Více hydratační vody bylo uvolněno s vysokomolekulárním hyaluronanem, neboť relativní rychlost dosahuje větších absolutních hodnot.

Kladná změna entalpie byla prisuzována desolvataci některých neiontových skupin v důsledku interakce [76]. Nové nekovalentní vazby v systému v průběhu interakcí pravděpodobně nevznikaly [77, 78]. Ze záznamů ITC bylo patrné, že Gibbsova volná energie byla tvořena především entropickým příspěvkem. Takto velký entropický příspěvek vznikal pravděpodobně také z uvolnění molekul vody v průběhu titrace [79]. Data tedy ukazovala na důležitou roli destrukce hydratačního obalu při interakcích hyaluronan-arginin. Navíc vztah mezi strmými změnami titračních křivek a molárním poměrem v těchto interakcích ukazoval na zapojení nabitých skupin a elektrostatických sil (a elektrostrikce).

Byl také pozorován kombinovaný vliv molekulových hmotností oligomerů argininu a hyaluronanu u dekamery, dodekamery a triakontamery argininu. Nižší hodnoty relativní rychlosti byly pozorovány pro hyaluronan o síle 1 540 kDa a dodekamer argininu ve srovnání s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 9 kDa. To znamená vyšší množství vody uvolněné z hyaluronanu s vysokou molekulovou hmotností. To bylo v souladu s menší změnou entalpie a nižším entropickým příspěvkem naměřeným pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 9 kDa, zejména pro dodekamer a triakontamer argininu. Situace byla podobná pro triakontamer argininu, ale 9 kDa hyaluronan vykázal mírnější pokles na ultrazvukové titrační křivce. Pro obě molekulové hmotnosti hyaluronanu byl však pozorován vývoj intenzivního zákalu během titrace triakontamerem argininu, který vyústil ke vzniku sraženiny kolem molárního poměru 1.

Největší rozdíl mezi oběma použitými technikami nastal v případě dekameru argininu. Zatímco ultrazvuková spektroskopie nerozlišovala mezi dekamerem a vyššími oligomery argininu, v případě ITC dekamer vykázal specifické výsledky, které nesdílely rysy jiných oligomerů argininu. Unikátní výsledky dekameru argininu získané pomocí ITC stále do jisté míry připomínaly výsledky ultrazvukových titrací a vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu byl podobný jako v případě dodekameru. Maximum na ITC křivce odpovídalo prudkému poklesu v záznamu relativní ultrazvukové rychlosti.

Obě metody používané v této práci neposkytovaly dostatek chemických informací, které by mohly vysvětlit termální chování dekameru argininu v průběhu interakcí s hyaluronanem. U kationtových postranních řetězců argininových oligomerů byla zjištěna schopnost tvorby stejně nabitých kontaktních iontových párů ve vodném prostředí [80]. Přestože tato schopnost není limitovaná počtem monomerních jednotek oligomeru, mohla by tato schopnost vést k odlišnému chování právě dekameru argininu. Je možné, že právě 10 monomerů argininu vede ke specifické dimenzi a tvaru oligomeru argininu, které umožňují specifické interakce s hyaluronanem. U lysinu, který nemá schopnost tvorby stejně nabitých kontaktních iontových párů, byla na záznamu z ITC nalezena pouze standardní sigmoidní křivka.

Nejnižší molekulové hmotnosti hyaluronanu 9 a 16 kDa, které jsou v tyčinkové konformaci [13], měly ze všech studovaných molekulových hmotností hyaluronanu ve vodě v případě dodekameru a triakontameru nejnižší absolutní hodnoty standardního entropického příspěvku, stejně jako standardní interakční Gibbsovy energie. Entalpický příspěvek narůstal pouze mírně s rostoucí molekulovou hmotností hyaluronanu. V případě odlišného dekameru argininu byl desolvatační model pozorován pouze pro 9 kDa hyaluronan. Pro vyšší molekulové hmotnosti hyaluronanu zůstal pouze model dvou typů vazných míst. Z hlediska ultrazvukové spektroskopie dosáhl 9 kDa hyaluronan nejmenší změny v relativní ultrazvukové rychlosti ze všech studovaných molekulových hmotností hyaluronanu u všech oligomerů. Je tedy pravděpodobné, že tyčinková konformace hyaluronanu uvolňuje v průběhu interakcí menší množství hydratační vody [79]. Naopak ostatní molekulové hmotnosti hyaluronanu v konformaci náhodného klubka [81] mají entropický příspěvek pro daný oligomer argininu ve vodě přibližně stejný. Hyaluronan s molekulovou hmotností 109 kDa, jehož konformace je na blízko přechodu mezi tyčinkou a náhodným klubkem [14], se podle mikrokolorimetrických měření a dat z HR-US jevil při interakcích s oligomery argininu více jako náhodné klubko.

Interakce argininových oligomerů s nejkratším hyaluronanem také vykázala nejvyšší citlivost na přítomnost dalších iontů v roztoku. Tyto interakce byly nejvíce potlačeny se vzrůstající iontovou silou.

Pokud jde o účinek molekulové hmotnosti hyaluronanu, zdá se, že nejdůležitějším faktorem byla jeho konformace, tedy zda se vyskytoval v konformaci tyčinky nebo náhodného klubka. Studované molekulové hmotnosti hyaluronanu v tyčinkové

konformaci (9 a 16 kDa) se v jednotlivých parametrech ITC a HR-US liší velmi výrazně od delších řetězců hyaluronanu v konformaci náhodného klubka. Konformace řetězce hyaluronanu byla tedy relevantní pro interakce s oligomery argininu, jakož i pro jejich citlivost na iontovou sílu.

Z hlediska účinku iontů na interakce došlo k velmi dobré korelaci mezi výsledky získanými jak z ITC tak z HR-US pro prostředí PBS, i pro prostředí s různými iontovými silami. Bod vysycení vazebných interakcí byl v prostředí PBS v případě obou technik posunut do molárního poměru kolem 1,5 pro vysokomolekulární hyaluronan a je také dobře patrné, že interakce byly mnohem méně intenzivní v případě nízkomolekulárního hyaluronanu. V prostředí PBS v případě triakontameru argininu, ITC detekovalo vzrůstající absolutní hodnoty standardní interakční Gibbsovy energie a entropického příspěvku s rostoucí molekulovou hmotností hyaluronanu až do 680 kDa. Entalpický příspěvek narůstal s rostoucí molekulovou hmotností hyaluronanu pouze slabě.

V prostředích s rostoucí koncentrací chloridu sodného, tedy s rostoucí iontovou silou, nebyly zaznamenány žádné podstatné změny na titračních křivkách s výjimkou 150 mM koncentrace NaCl. V tomto případě titrační křivka zaznamenaná pomocí HR-US vykazovala pouze velmi malý a statisticky nevýznamný pokles v relativní rychlosti kolem molárního poměru 1,7 a v případě ITC nebyly zaznamenány tepelné efekty v průběhu titrace. Nicméně s rostoucí iontovou silou docházelo k poklesu hodnot velikosti změny standardní entalpie stejně jako k poklesu absolutní hodnoty minimální relativní ultrazvukové rychlosti. Obecným rysem jak interakcí v prostředí PBS tak v prostředích s dalšími ionty byl výrazný pokles velikosti standardní reakční entalpie v porovnání s vodnými roztoky. Interakce ve vodě byly nejintenzivnější a uvolňovaly největší množství hydratační vody. Díky tomu dosahovaly nejnižších hodnot relativních ultrazvukových rychlostí. S rostoucí iontovou silou množství uvolněné hydratační vody postupně klesalo.

Dostatečně velká iontová síla dokázala potlačit interakce mezi hyaluronanem a oligomery argininu, u kterých byla prokázána přítomnost ve vodě. S narůstající délkou polyargininového řetězce se zvyšovala schopnost lépe odolávat vlivu iontů v prostředí, a tak zatímco triakontamer argininu byl schopen interagovat v prostředí PBS, dodekamer už interagoval pouze v roztocích o koncentraci NaCl do 100 mM. Molekulární hmotnost hyaluronanu měla podobný vliv, neboť s rostoucí molekulovou hmotností hyaluronanu dochází k zesílení interakcí v daném prostředí.

U hyaluronanu byla v jeho struktuře popsána existence hydrofobních částí [11]. O postranních řetězcích oligomerů argininu tvořených uhlovodíkovými řetězci je možné uvažovat jako o místech vhodných pro hydrofobní interakce. Speciální schopnost argininu vytvářet stejně nabitě kontaktní iontové páry pravděpodobně stála za unikátním chováním pozorovaným pro dekamer argininu.

Přestože ze záznamu z ITC nebyl zánik nebo vznik vodíkových můstků patrný, v případě hyaluronanu bylo prokázáno, že hyaluronan interaguje s vodou ve svém okolí za tvorby vodíkových můstků [82]. Pravděpodobně docházelo současně

v průběhu interakcí k zániku původních vodíkových můstků a vzniku nových, díky čemuž nebylo možné ze záznamu ITC tuto skutečnost pozorovat.

Konečně také molekulová hmotnost hyaluronanu, respektive jeho konformace, ať už tyčinková, nebo konformace náhodného klubka měla vliv na interakce s oligomery argininu a také na citlivost interakcí na iontovou sílu.

4.3 INTERAKCE HYALURONAN-CECROPIN B STUDOVANÉ POMOCÍ HR-US A ITC

V rámci této kapitoly byly zkoumány interakce zásaditého antimikrobiálního peptidu cecropinu B a hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech s využitím technik ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením a izotermické titrační kalorimetrie v prostředí vody a PBS. Cílem bylo charakterizovat interakce mezi oběma biopolymery. Na rozdíl od předchozí kapitoly, která byla spíše modelovým systémem, skrývá tato kapitola i praktické možnosti využití jako potenciálního nosičového systému.

4.3.1 Výsledky

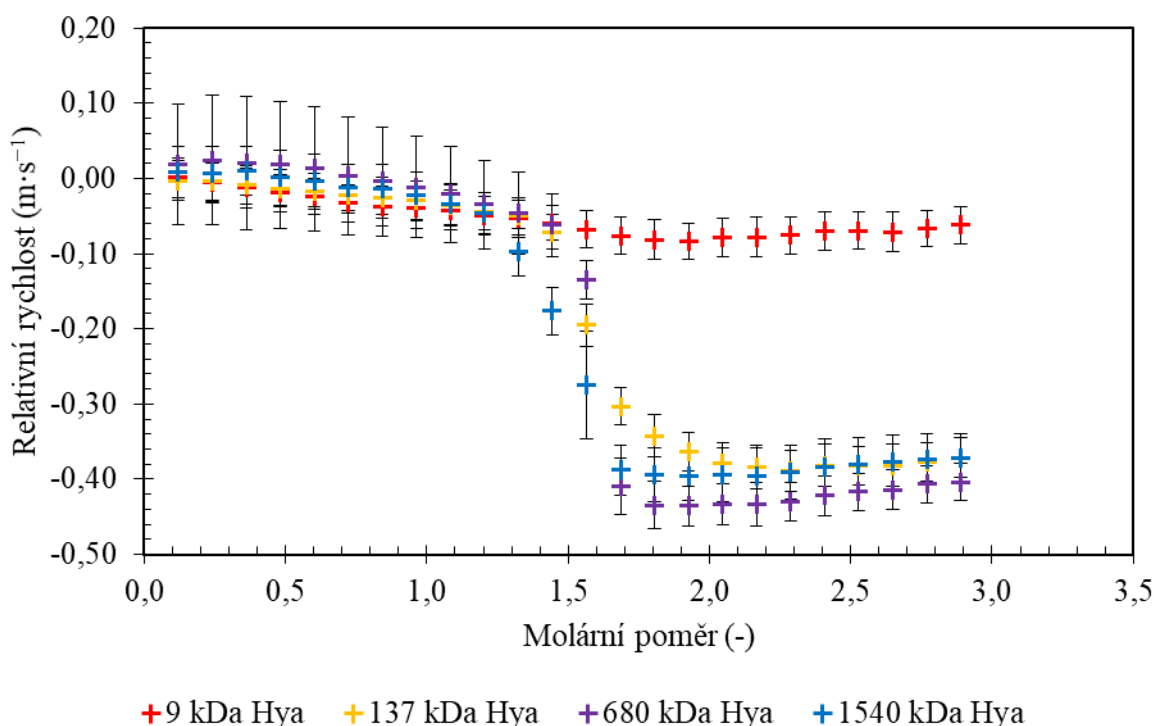
Základní informace o titracích cecropinu B do hyaluronanu byly získány pomocí jednoduchého vizuálního pozorování. Pro tato pozorování byly vybrány molekulové hmotnosti hyaluronanu 9, 680 a 1 540 kDa. Výsledky všech vizuálních pozorování jsou shrnuty v tabulce (

Tabulka P 4). V prostředí PBS nebyly pozorovány žádné změny a roztoky zůstaly čiré po celou dobu titrace. V případě vodných roztoků dochází k přechodu systému od čirého až po sraženiny u vysokomolekulárního hyaluronanu. K těmto změnám dochází ve vodě zpravidla kolem molárního poměru 1,4.

Výsledky z HR-US

Ve vodném prostředí vizuální pozorování ukázala, že k interakcím docházelo se všemi molekulovými hmotnostmi hyaluronanu. V případě nejnížší molekulové hmotnosti 9 kDa byly interakce slabé, vytvářely pouze velmi jemný zákal a za vyšších molárních poměrů docházelo k vyčerení roztoku. To se na datech získaných z ultrazvukového spektrometru projevilo jako velmi mírný pokles v relativní rychlosti. Na rozdíl od hyaluronanu s nejnížší molekulovou hmotností došlo u všech ostatních studovaných molekulových hmotností hyaluronanu k výraznému poklesu relativní rychlosti v průběhu titrace díky uvolnění hydratační vody z hydratačního obalu. Změna velikosti relativní rychlosti v průběhu titrace je pro všechny studované molekulové hmotnosti zobrazena v grafu na obrázku (Obrázek 12). Pokles se zastavil kolem molárního poměru 1,7, tedy za předpokládaným bodem nábojové ekvivalence, poté relativní rychlost opět mírně narůstala.

U všech molekulových hmotností docházelo k pozvolnému poklesu v relativní rychlosti, následovaným prudkým propadem v relativní rychlosti, s výjimkou 9 kDa hyaluronanu, kde k propadu nedošlo a změna relativní rychlosti je pouze velmi mírná.



Obrázek 12: Závislost relativní rychlosti na molárním poměru pro titraci cecropinu B do roztoků hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)

Vliv prostředí

Interakce cecropinu B byly studovány i v prostředí PBS, které by mělo imitovat fyziologické podmínky. Experimenty byly prováděny s hyaluronanem o nejvyšší molekulové hmotnosti 1 540 kDa. Bylo zjištěno, že relativní rychlost, stejně jako zeslabení v cele se vzorkem, zůstává konstantní v celém průběhu titrace. Výsledky vizuálních pozorování jsou shrnuté v tabulce (

Tabulka P 4) a nevykázaly zakalení roztoku nebo vznik sraženin a roztok zůstal, v případě obou testovaných molekulových hmotností hyaluronanu 9 a 1 540 kDa, čirý.

Výsledky z ITC

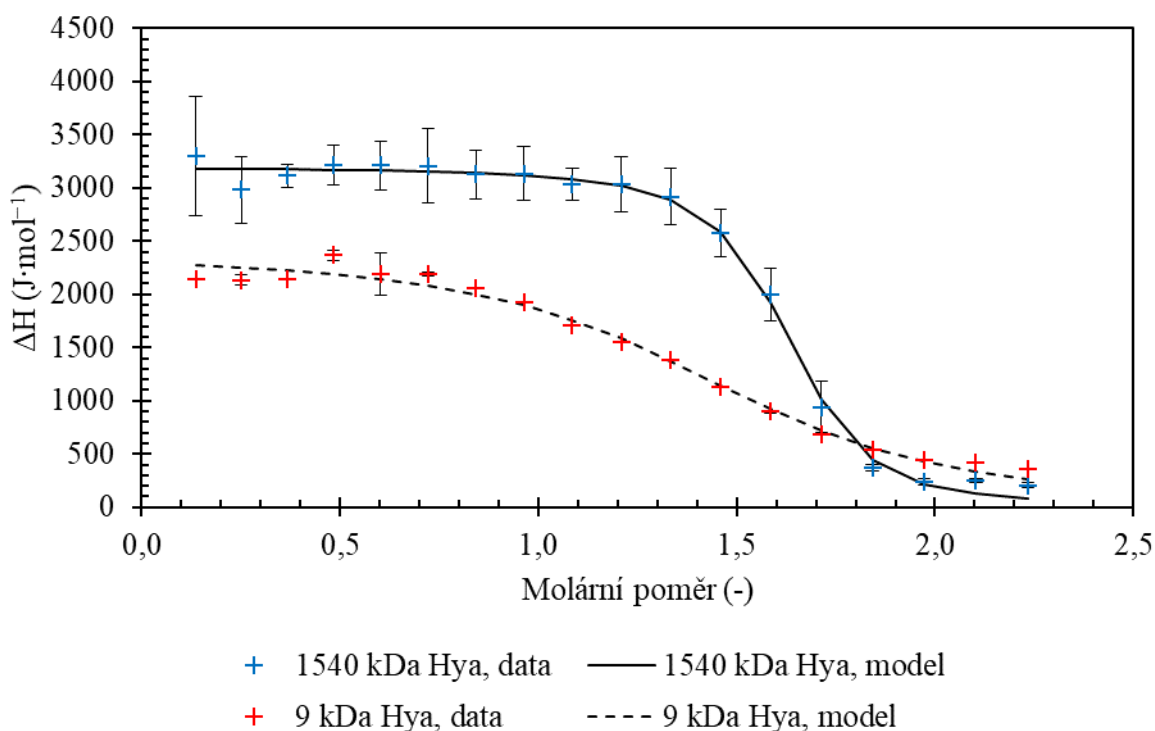
Pomocí izotermické titrační kalorimetrie byly stanoveny základní termodynamické parametry interakcí mezi hyaluronanem a cecropinem B. Bylo zjištěno, že všechny interakce měly endotermický charakter. U všech titrací byl pozorován typický sigmoidní tvar titračních křivek. Příklad pro molekulové hmotnosti hyaluronanu 9 a 1 540 kDa je uveden v grafu na obrázku (Obrázek 13).

Tento tvar titračních křivek ukazoval na přítomnost interakcí mezi hyaluronanem a antimikrobiálním peptidem od prvního přídavku až do vyčerpání vazných míst na hyaluronanu v okolí nábojového poměru 1,5 nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu.

Pro stanovení termodynamických parametrů byly titrace prokládány modelem jednoho typu vazného místa. Termodynamické parametry interakcí se pro jednotlivé molekulové hmotnosti hyaluronanu příliš nelišily a poměr standardních entalpických

a standardních entropických příspěvků byl velmi podobný. Interakce mezi antimikrobiálním peptidem a hyaluronanem byly charakterizovány malou nepříznivou hodnotou standardní entalpie a byly hnané entropicky.

Nejnižší molekulová hmotnost hyaluronanu měla nejvyšší hodnotu disociační konstanty, zatímco molekulové hmotnosti hyaluronanu nad 137 kDa měly přibližně stejnou hodnotu disociační konstanty, která byla nižší. Disociační konstanta byla stanovena s poměrně vysokou chybou.



Obrázek 13: Graf zobrazující ITC záznamy titrací cecropinu B do roztoku 9 a 1 540 kDa hyaluronanu ve vodě (25 °C). Pro vyhodnocení dat byl použit model jednoho typu vazného místa.

Vliv prostředí

Stejně jako v případě ultrazvukové spektroskopie byly interakce testovány i v prostředí PBS. Výsledky se shodovaly se zjištěními z ultrazvukového spektrometru, a sice že v průběhu titrace po odečtení rozpouštěcích tepel nebylo zaznamenáno žádné měřitelné teplo.

4.3.2 Diskuse

Typická sigmoidní křivka na ITC byla pro cecropin B získána při interakcích se všemi studovanými molekulovými hmotnostmi hyaluronanu ve vodě. Záznamy z ITC byly v souladu s daty získanými pomocí HR-US. Prudký pokles na sigmoidní křivce koresponduje s náhlým poklesem relativní ultrazvukové rychlosti. Obě techniky ukázaly, že se interakce lišily při použití různých molekulových hmotností hyaluronanu.

Pokles v relativní rychlosti obvykle indikuje změnu v hydratačních obalech molekul. Protože je voda v hydratačním obalu méně stlačitelná v porovnání

s objemovou vodou [70], je také hustší [71], což pomáhá v šíření zvukových vln [58], dochází k poklesu relativní rychlosti, pokud je voda z hydratačního obalu uvolňovaná.

Cecropin B tedy narušil hydratační obal hyaluronanu za tvorby asociátů se společným hydratačním obalem, který obsahuje méně molekul hydratační vody v porovnání s množstvím hydratační vody obsažené v obou hydratačních obalech. Relativní rychlost klesala až do vysycení všech vazebných míst na hyaluronanu. Poté již k dalšímu uvolňování hydratační vody nedocházelo a relativní rychlost začala pouze mírně růst. Tento nárůst byl připsán částečnému rozpouštění precipitátu díky ředění. Je zajímavé, že tyto interakce nebyly vysyceny kolem molárního poměru 1, ale až kolem molárního poměru 1,5. Posun k vyšším hodnotám molárních poměrů mohl být zapříčiněn nedostupností některých nabitých skupin cecropinu B pro interakce.

Kladná změna entalpie byla přisuzována desolvataci některých neiontových skupin v důsledku interakce [76]. Nové nekovalentní vazby v systému v průběhu interakcí pravděpodobně nevznikají [77, 78]. Gibbsova volná energie byla tvořena především entropickým příspěvkem. Takto velký entropický příspěvek vznikal pravděpodobně také z uvolnění molekul vody v průběhu titrace [79]. Data tedy ukazovala na důležitou roli tvorby společného hydratačního obalu při interakcích hyaluronan-cecropin B.

S ohledem na komplikovanou strukturu antimikrobiálního peptidu připadaly v úvahu také hydrofobní interakce s některými z hydrofobních aminokyselinových zbytků [83] ve struktuře cecropinu B, který se v roztoku vyskytuje v konformaci náhodného klubka [84–86]. U hyaluronanu byla v jeho struktuře popsána existence hydrofobních částí [87], které by se mohly na interakcích podílet, především když je narušen hydratační obal interagujících biopolymerů.

Byl také pozorován vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu na interakce. Nižší hodnoty relativní rychlosti byly pozorovány pro hyaluronan o síle 1 540 kDa ve srovnání s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 9 kDa. Zároveň platí, že nízkomolekulární hyaluronan nevytvářel, na rozdíl od vysokomolekulárního, při interakci sraženiny.

Nejnižší molekulová hmotnost hyaluronanu 9 kDa, která je v tyčinkové konformaci [13], měla ze všech studovaných molekulových hmotností hyaluronanu ve vodě nejnížší absolutní hodnoty standardního entropického příspěvku, stejně jako standardní interakční Gibbsovy energie. Entalpický příspěvek narůstal pouze mírně s rostoucí molekulovou hmotností hyaluronanu. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky z ultrazvukové spektroskopie, kde 9 kDa hyaluronan dosáhl nejmenší změny v relativní ultrazvukové rychlosti ze všech studovaných molekulových hmotností hyaluronanu. Je tedy pravděpodobné, že tyčinková konformace hyaluronanu uvolňovala v průběhu interakcí menší množství hydratační vody [79]. Naopak ostatní molekulové hmotnosti hyaluronanu v konformaci náhodného klubka [81] měly entropický příspěvek ve vodě přibližně stejný. Hyaluronan s molekulovou hmotností 137 kDa, jehož konformace byla blízko přechodu mezi tyčinkou

a náhodným klubkem [13], se jevil při interakcích cecropinem B více jako náhodné klubko.

V prostředí PBS, které mělo imitovat prostředí fyziologické, bylo pomocí obou technik zjištěno, že k interakcím mezi polymery pravděpodobně nedocházelo. Ke studiu interakcí zde byl použit hyaluronan s nejvyšší molekulovou hmotností 1 540 kDa, u kterého byl předpoklad možných interakcí nejvyšší s ohledem na výsledky, kterých bylo dosaženo ve vodě.

Dostatečně velká iontová síla dokázala potlačit interakce mezi hyaluronanem a antimikrobiálním peptidem i v systémech, ve kterých byla jejich přítomnost ve vodě prokázána. Molekulová hmotnost hyaluronanu neměla na výsledek interakcí v prostředí PBS vliv.

Bylo zjištěno, že existuje výrazný rozdíl mezi tyčinkovou konformací hyaluronanu a konformací náhodného klubka při interakcích s cecropinem B.

Z výsledků je patrné, že systém nebyl schopen ustát iontovou sílu fyziologického prostředí, ale mohl by být vhodný například jako základ pro topické aplikace na kůži či některé sliznice [88–90].

5 ZÁVĚR

Předložená dizertační práce pojednává o základním výzkumu interakcí, jejich charakterizaci metodami ultrazvukové spektroskopie a izotermické titrační kalorimetrie a potenciometrickými titracemi mezi hyaluronanem a (oligo)aminokyselinami, především argininem, respektive bazickým antimikrobiálním peptidem cecropinem B. Tato problematika dosud nebyla ve světové vědecké literatuře zkoumána. Dizertace tak představuje originální příspěvek k porozumění chování hyaluronanu ve vodném prostředí a jeho mezimolekulových interakcí.

Monomerní aminokyseliny byly studovány zejména pomocí potenciometrických titrací, v průběhu kterých bylo měřeno pH titrovaných roztoků. S pomocí této techniky se nepodařilo potvrdit přítomnost interakcí, což je v souladu s výsledky z ultrazvukové spektroskopie, která v případě monomerního argininu také žádné interakce neodhalila.

V případě argininových oligomerů bylo úspěšně ověřeno, že oligomery argininu interagují s hyaluronanem až od určité délky oligomeru argininu, přechod nastává mezi oktamerem a dekamerem argininu, vyšší oligomery jednoznačně interagují, zatímco u kratších se interakce prokázat nepodařilo nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu. Interakce bylo možné potlačit dostatečně vysokou iontovou silou za předpokladu, že řetězec oligomeru argininu nebyl příliš dlouhý nebo molekulová hmotnost hyaluronanu příliš nízká. Tyčinková konformace hyaluronanu nebo konformace náhodného klubka hyaluronanu byly pro interakce s argininovými oligomery důležité z hlediska intenzity interakcí, obecně se interakce s hyaluronanem v tyčinkové konformacijevily jako slabší a snadněji ovlivnitelné iontovou silou.

Interakce mezi argininovými oligomery a hyaluronanem byly vysvětleny kombinací účinků jednotlivých sil. Kromě elektrostatických interakcí kombinovaných s elektrostrikcí působí pravděpodobně ještě hydratační síly (uvolňování molekul vody z hyaluronanového hydratačního obalu), vodíkové vazby nebo hydrofobní kontakty mezi desolvatovanými částmi (makro)molekul spolu se specifickými konformacemi hyaluronanu a argininových oligomerů, které zahrnují schopnost argininu tvořit kontaktní iontové páry.

Navíc byly objeveny nečekané formy interakcí u specifických délek oligomeru argininu, nicméně použité techniky neposkytují dostatečné množství chemických informací pro jejich detailnější charakterizaci. Zde se otevírá zajímavá možnost pro další experimenty nebo molekulární modelování pro získání detailnějších informací o probíhajících procesech.

Zvolený zástupce bazických antimikrobiálních peptidů cecropin B prokázal pouze omezenou schopnost interakcí s hyaluronanem, které byly z podstaty podobné jako interakce mezi hyaluronanem a oligomery argininu. Ve vodě interakce probíhaly se všemi zvolenými molekulovými hmotnostmi hyaluronanu. Stejně jako v případě oligomerů argininu interakce výrazně ovlivňovala molekulová hmotnost

hyaluronanu. Ve fyziologickém prostředí nebyl cecropin B schopen s hyaluronanem interagovat nezávisle na zvolené molekulové hmotnosti hyaluronanu. Případné praktické aplikace jsou tak velmi limitované, především na topické podání. Pro praktické aplikace ve fyziologickém prostředí by bylo nutné najít jiný antimikrobiální peptid, který by byl schopen silnějších interakcí s hyaluronanem v prostředí o vyšší iontové síle.

Protože všechny experimenty probíhaly při teplotě 25 °C, další výzkum by se mohl zabývat interakcemi za zvýšené teploty, zejména fyziologické, 37 °C, a to jak v případě oligomerů argininu, tak u cecropinu B, zejména s ohledem na prostředí, ve kterém se interakce mezi hyaluronanem a aminokyselinami běžně odehrávají. Dále by bylo vhodné podobně podrobně prozkoumat chování oligomerů lysinu při interakcích s hyaluronanem, především pro jeho neschopnost tvořit, na rozdíl od oligomerního argininu, kontaktní iontové páry. Sraženina vzniklá při interakcích mezi antimikrobiálním peptidem cecropinem B a hyaluronanem při interakcích ve vodě by mohla být studována s ohledem na možnost jejího převodu na mikro- či nano-částice pro nosičové aplikace, pokud by již ve vodě vytvořená sraženina byla schopná existovat ve fyziologickém prostředí.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MEYER, Karl. THE BIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF HYALURONIC ACID AND HYALURONIDASE. *Physiological Reviews* [online]. 1947, **27**(3), 335–359. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.1947.27.3.335
- [2] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTĚS, Robert STERN a Peter GEMEINER. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters* [online]. 2006, **29**(1), 17–25. ISSN 0141-5492. Dostupné z: doi:10.1007/s10529-006-9219-z
- [3] GIRISH, K.S. a K. KEMPARAJU. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sciences* [online]. 2007, **80**(21), 1921–1943. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2007.02.037
- [4] LAURENT, Torvard C. a J. Robert E. FRASER. Hyaluronan. *The FASEB Journal* [online]. 1992, **6**(7), 2397–2404. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fasebj.6.7.1563592
- [5] LAURENT, Torvard C. Biochemistry of Hyaluronan. *Acta Oto-Laryngologica* [online]. 1987, **104**(sup442), 7–24. ISSN 0001-6489. Dostupné z: doi:10.3109/00016488709102833
- [6] CLELAND, Robert L., John L. WANG a David M. DETWEILER. Polyelectrolyte properties of sodium hyaluronate. 2. Potentiometric titration of hyaluronic acid. *Macromolecules* [online]. 1982, **15**(2), 386–395. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/ma00230a037
- [7] MERO, Anna a Monica CAMPISI. Hyaluronic Acid Bioconjugates for the Delivery of Bioactive Molecules. *Polymers* [online]. 2014, **6**(2), 346–369. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym6020346
- [8] PREHM, Peter. Polysaccharides I Polysaccharides from Prokaryotes. In: E. J. VANDAMME, S. DE BAETS a A. STEINBUCHER, ed. *Biopolymers*. B.m.: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2003. ISBN 3-527-30226-3.
- [9] HARGITTAI, István a Magdolna HARGITTAI. Molecular structure of hyaluronan: an introduction. *Structural Chemistry* [online]. 2008, **19**(5), 697–717. ISSN 1040-0400. Dostupné z: doi:10.1007/s11224-008-9370-3
- [10] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární Medicína* [online]. 2008, **53**(No. 8), 397–411. ISSN 03758427. Dostupné z: doi:10.17221/1930-VETMED
- [11] SCOTT, John E. Secondary structures in hyaluronan solutions: chemical and biological implications. In: David EVERED a Julie WHELAN, ed. *Ciba Foundation Symposium 143 - The Biology of Hyaluronan* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 1989, Novartis Foundation Symposia, s. 6–20. ISBN 9780470513774. Dostupné z: doi:10.1002/9780470513774
- [12] SCOTT, John E. a Frank HEATLEY. Biological Properties of Hyaluronan in Aqueous Solution Are Controlled and Sequestered by Reversible Tertiary Structures, Defined by NMR Spectroscopy. *Biomacromolecules* [online]. 2002, **3**(3), 547–553. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm010170j
- [13] SIMULESCU, Vasile, Jakub MONDEK, Michal KALINA a Miloslav PEKAŘ. Kinetics of long-term degradation of different molar mass hyaluronan solutions studied by SEC-MALLS. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2015, **111**, 257–262. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2014.12.005
- [14] SIMULESCU, Vasile, Michal KALINA, Jakub MONDEK a Miloslav PEKAŘ. Long-term degradation study of hyaluronic acid in aqueous solutions without protection against microorganisms. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2016, **137**, 664–668. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2015.10.101
- [15] TOOLE, B.P. Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 1990, **2**(5), 839–844. ISSN 09550674. Dostupné z: doi:10.1016/0955-0674(90)90081-O
- [16] PONTA, Helmut, Larry SHERMAN a Peter A. HERRLICH. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2003, **4**(1), 33–45.

ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm1004

- [17] KOHDA, Daisuke, Craig J MORTON, Ashfaq A PARKAR, Hideki HATANAKA, Fuyuhiko M INAGAKI, Iain D CAMPBELL a Anthony J DAY. Solution Structure of the Link Module: A Hyaluronan-Binding Domain Involved in Extracellular Matrix Stability and Cell Migration. *Cell* [online]. 1996, **86**(5), 767–775. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)80151-8
- [18] ALMOND, A. Hyaluronan. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2007, **64**(13), 1591–1596. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-007-7032-z
- [19] KAROUSOU, Evgenia, Suniti MISRA, Shibnath GHATAK, Katalin DOBRA, Martin GÖTTE, Davide VIGETTI, Alberto PASSI, Nikos K. KARAMANOS a Spyros S. SKANDALIS. Roles and targeting of the HAS/hyaluronan/CD44 molecular system in cancer. *Matrix Biology* [online]. 2017, **59**, 3–22. ISSN 0945053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matbio.2016.10.001
- [20] NAGAE, Masamichi a Yoshiki YAMAGUCHI. Three-Dimensional Structural Aspects of Protein–Polysaccharide Interactions. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2014, **15**(3), 3768–3783. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms15033768
- [21] RAO, N. Vijayakameswara, Hong Yeol YOON, Hwa Seung HAN, Hyewon KO, Soyoung SON, Minchang LEE, Hansang LEE, Dong-Gyu JO, Young Mo KANG a Jae Hyung PARK. Recent developments in hyaluronic acid-based nanomedicine for targeted cancer treatment. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2016, **13**(2), 239–252. ISSN 1742-5247. Dostupné z: doi:10.1517/17425247.2016.1112374
- [22] DAY, Anthony J. a Glenn D. PRESTWICH. Hyaluronan-binding Proteins: Tying Up the Giant. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2002, **277**(7), 4585–4588. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.R100036200
- [23] BANERJI, Suneale, Alan J WRIGHT, Martin NOBLE, David J MAHONEY, Iain D CAMPBELL, Anthony J DAY a David G JACKSON. Structures of the Cd44–hyaluronan complex provide insight into a fundamental carbohydrate-protein interaction. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. 2007, **14**(3), 234–239. ISSN 1545-9993. Dostupné z: doi:10.1038/nsmb1201
- [24] PLAZINSKI, Wojciech a Agnieszka KNYS-DZIECIUCH. Interactions between CD44 protein and hyaluronan: insights from the computational study. *Mol. BioSyst.* [online]. 2012, **8**(2), 543–547. ISSN 1742-206X. Dostupné z: doi:10.1039/C2MB05399C
- [25] BHATTACHARYA, D. S., D. SVECHKAREV, J. J. SOUCHEK, T. K. HILL, M. A. TAYLOR, A. NATARAJAN a A. M. MOHS. Impact of structurally modifying hyaluronic acid on CD44 interaction. *J. Mater. Chem. B* [online]. 2017, **5**(41), 8183–8192. ISSN 2050-750X. Dostupné z: doi:10.1039/C7TB01895A
- [26] LEITE, Michel L., Nicolau B. DA CUNHA a Fabricio F. COSTA. Antimicrobial peptides, nanotechnology, and natural metabolites as novel approaches for cancer treatment. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2018, **183**, 160–176. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2017.10.010
- [27] SANTOS, Hélder A., José A. MANZANARES, Lasse MURTOMÄKI a Kyösti KONTTURI. Thermodynamic analysis of binding between drugs and glycosaminoglycans by isothermal titration calorimetry and fluorescence spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2007, **32**(2), 105–114. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2007.06.003
- [28] GRYMONTÉ, Kristopher R., Bethany A. STAGGEMEIER, Paul L. DUBIN a Kevin W. MATTISON. Identification by Integrated Computer Modeling and Light Scattering Studies of an Electrostatic Serum Albumin-Hyaluronic Acid Binding Site. *Biomacromolecules* [online]. 2001, **2**(2), 422–429. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm005656z
- [29] RUSU-BALAITA, L., J. DESBRIERES a M. RINAUDO. Formation of a biocompatible polyelectrolyte complex: chitosan-hyaluronan complex stability. *Polymer Bulletin* [online]. 2003, **50**(1–2), 91–98. ISSN 0170-0839. Dostupné z: doi:10.1007/s00289-003-0144-1
- [30] FURLANI, Franco, Pasquale SACCO, Eva DECLEVA, Renzo MENEGAZZI, Ivan DONATI, Sergio PAOLETTI a Eleonora MARSICH. Chitosan Acetylation Degree Influences the Physical Properties of Polysaccharide Nanoparticles: Implication for the Innate Immune Cells Response. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2019, **11**(10), 9794–9803. ISSN 1944-8244. Dostupné

z: doi:10.1021/acsami.8b21791

- [31] KARGEROVÁ, Andrea a Miloslav PEKAŘ. High-Resolution Ultrasonic Spectroscopy Study of Interactions between Hyaluronan and Cationic Surfactants. *Langmuir* [online]. 2014, **30**(40), 11866–11872. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la501852a
- [32] CHYTIL, Martin, Martin TROJAN a Alexander KOVALENKO. Study on mutual interactions and electronic structures of hyaluronan with Lysine, 6-Aminocaproic acid and Arginine. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2016, **142**, 8–15. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2016.01.035
- [33] KROUSKÁ, Jitka. *Interactions between Hyaluronan and Surface Active Substances*. B.m., 2012. Brno University of Technology, Faculty of Chemistry.
- [34] YE, Fengbin, Yuanyi XIE, Henrik JENSEN, Susan Weng LARSEN, Anan YAGHMUR, Claus LARSEN a Jesper ØSTERGAARD. Interaction of Amino Acid and Dipeptide β -Naphthylamide Derivatives with Hyaluronic Acid and Human Serum Albumin Studied by Capillary Electrophoresis Frontal Analysis. *Chromatographia* [online]. 2013, **76**(1–2), 49–57. ISSN 0009-5893. Dostupné z: doi:10.1007/s10337-012-2369-3
- [35] OYARZUN-AMPUERO, Felipe A., Francisco M. GOYCOOLEA, Dolores TORRES a Maria J. ALONSO. A new drug nanocarrier consisting of polyarginine and hyaluronic acid. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2011, **79**(1), 54–57. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2011.04.008
- [36] KIM, Eun-Joong, Gayong SHIM, Kwangmyeung KIM, Ick Chan KWON, Yu-Kyoung OH a Chang-Koo SHIM. Hyaluronic acid complexed to biodegradable poly L-arginine for targeted delivery of siRNAs. *The Journal of Gene Medicine* [online]. 2009, **11**(9), 791–803. ISSN 1099498X. Dostupné z: doi:10.1002/jgm.1352
- [37] TURGEON, S.L., C. SCHMITT a C. SANCHEZ. Protein–polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. 2007, **12**(4–5), 166–178. ISSN 13590294. Dostupné z: doi:10.1016/j.cocis.2007.07.007
- [38] COOPER, Christy L., Ann GOULDING, A. Basak KAYITMAZER, Serge ULRICH, Serge STOLL, Sibel TURKSEN, Shin-ichi YUSA, Anil KUMAR a Paul L. DUBIN. Effects of Polyelectrolyte Chain Stiffness, Charge Mobility, and Charge Sequences on Binding to Proteins and Micelles. *Biomacromolecules* [online]. 2006, **7**(4), 1025–1035. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm050592j
- [39] KAYITMAZER, A. B., E. SEYREK, P. L. DUBIN a B. A. STAGGEMEIER. Influence of Chain Stiffness on the Interaction of Polyelectrolytes with Oppositely Charged Micelles and Proteins †. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2003, **107**(32), 8158–8165. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/jp034065a
- [40] LENORMAND, Hélène, Brigitte DESCHREVEL, Frédéric TRANCHEPAIN a Jean-Claude VINCENT. Electrostatic interactions between hyaluronan and proteins at pH 4: How do they modulate hyaluronidase activity. *Biopolymers* [online]. 2008, **89**(12), 1088–1103. ISSN 00063525. Dostupné z: doi:10.1002/bip.21061
- [41] LENORMAND, Hélène, Brigitte DESCHREVEL a Jean-Claude VINCENT. Chain length effects on electrostatic interactions between hyaluronan fragments and albumin. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2010, **82**(3), 887–894. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2010.06.011
- [42] LENORMAND, Hélène, Brigitte DESCHREVEL a Jean-Claude VINCENT. pH effects on the hyaluronan hydrolysis catalysed by hyaluronidase in the presence of proteins: Part I. Dual aspect of the pH-dependence. *Matrix Biology* [online]. 2010, **29**(4), 330–337. ISSN 0945053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matbio.2009.12.007
- [43] MORFIN, I., E. BUHLER, F. COUSIN, I. GRILLO a F. BOUÉ. Rodlike Complexes of a Polyelectrolyte (Hyaluronan) and a Protein (Lysozyme) Observed by SANS. *Biomacromolecules* [online]. 2011, **12**(4), 859–870. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm100861g
- [44] MALAY, Özge, Oguz BAYRAKTAR a Ayşegül BATIGÜN. Complex coacervation of silk fibroin and hyaluronic acid. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2007, **40**(4), 387–393. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2006.09.017

- [45] WANG, Guangshun, Biswajit MISHRA, Kyle LAU, Tamara LUSHNIKOVA, Radha GOLLA a Xiuqing WANG. Antimicrobial Peptides in 2014. *Pharmaceuticals* [online]. 2015, **8**(1), 123–150. ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi:10.3390/ph8010123
- [46] BECHINGER, B. a S.-U. GORR. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *Journal of Dental Research* [online]. 2017, **96**(3), 254–260. ISSN 0022-0345. Dostupné z: doi:10.1177/0022034516679973
- [47] HANCOCK, Robert E.W a Robert LEHRER. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology* [online]. 1998, **16**(2), 82–88. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-7799(97)01156-6
- [48] ZASLOFF, Michael. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* [online]. 2002, **415**(6870), 389–395. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/415389a
- [49] GLUKHOV, Evgenia, Lori L. BURROWS a Charles M. DEBER. Membrane interactions of designed cationic antimicrobial peptides: The two thresholds. *Biopolymers* [online]. 2008, **89**(5), 360–371. ISSN 00063525. Dostupné z: doi:10.1002/bip.20917
- [50] BROWN, Kelly L a Robert EW HANCOCK. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Immunology* [online]. 2006, **18**(1), 24–30. ISSN 09527915. Dostupné z: doi:10.1016/j.coi.2005.11.004
- [51] LEI, Jun, Lichun SUN, Siyu HUANG, Chenhong ZHU, Ping LI, Jun HE, Vienna MACKEY, David H COY a Quanyong HE. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American journal of translational research*. 2019, **11**(7), 3919–3931. ISSN 1943-8141 (Print).
- [52] LAKSHMAIAH NARAYANA, Jayaram a Jyh-Yih CHEN. Antimicrobial peptides: Possible anti-infective agents. *Peptides* [online]. 2015, **72**, 88–94. ISSN 01969781. Dostupné z: doi:10.1016/j.peptides.2015.05.012
- [53] BRADSHAW, Jeremy P. Cationic Antimicrobial Peptides. *BioDrugs* [online]. 2003, **17**(4), 233–240. ISSN 1173-8804. Dostupné z: doi:10.2165/00063030-200317040-00002
- [54] GHARSALLAOUI, Adem, Nadia OULAHAL, Catherine JOLY a Pascal DEGRAEVE. Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2016, **56**(8), 1262–1274. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2013.763765
- [55] TOPPAZZINI, Mila, Anna COSLOVI, Manuela BOSCHELLE, Eleonora MARSICH, Monica BENINCASA, Renato GENNARO a Sergio PAOLETTI. Can the interaction between the antimicrobial peptide LL-37 and alginate be exploited for the formulation of new biomaterials with antimicrobial properties? *Carbohydrate Polymers* [online]. 2011, **83**(2), 578–585. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2010.08.020
- [56] FERSTL, Matthias, Markus DRECHSLER, Reinhard RACHEL, Matthias RISCHER, Jürgen ENGEL, Michael BACKOFEN a Achim GOEPFERICH. The Impact of Polyelectrolyte Structure on the Shape of Nanoassemblies with Cationic Peptides. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2013, **102**(8), 2599–2607. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.23619
- [57] PEKAŘ, Miloslav, J. KUČERÍK a D. ŠMEJKALOVÁ. Nové možnosti ultrazvukové spektroskopie v koloidní chemii. *CHEMagazín*. 2005, **15**(1), 12–14.
- [58] BUCKIN, Vitaly A. High-resolution ultrasonic spectroscopy. *Journal of Sensors and Sensor Systems* [online]. 2018, **7**(1), 207–217. ISSN 2194-878X. Dostupné z: doi:10.5194/jsss-7-207-2018
- [59] BUCKIN, Vitaly, Eugeny KUDRYASHOV a Breda O'DRISCOLL. High-Resolution Ultrasonic Spectroscopy for Material Analysis. *Spectroscopy perspectives*. 2002, (28), 38–31.
- [60] SMYTH, C., Breda O'DRISCOLL, Jayne LAWRENCE, Sinead HICKEY, Therese O'REAGAN a Vitaly BUCKIN. High-resolution ultrasonic spectroscopy analysis of microemulsions. *Pharmaceutical Technology Europe*. 2004, **16**(6), 44–49.
- [61] HICKEY, Sinead, M. Jayne LAWRENCE, Sue A. HAGAN a Vitaly BUCKIN. Analysis of the Phase Diagram and Microstructural Transitions in Phospholipid Microemulsion Systems Using High-Resolution Ultrasonic Spectroscopy. *Langmuir* [online]. 2006, **22**(13), 5575–5583. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la052735t

- [62] O'DRISCOLL, Breda, C. SMYTH, A. C. ALTING, R.W. VISSCHER a Vitaly BUCKIN. Recent applications for high – resolution ultrasonic spectroscopy. *American Laboratory*. 2003, 54–57.
- [63] KARGEROVÁ, A. a M. PEKAŘ. Densitometry and ultrasound velocimetry of hyaluronan solutions in water and in sodium chloride solution. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2014, **106**, 453–459. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2014.01.020
- [64] FREYER, Matthew W. a Edwin A. LEWIS. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. In: *Methods in Cell Biology* [online]. 2008, s. 79–113. ISBN 0123725208. Dostupné z: doi:10.1016/S0091-679X(07)84004-0
- [65] LIU, J a M K COWMAN. Thermal Analysis of Semi-Dilute Hyaluronan Solutions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* [online]. 2000, **59**(1), 547–557. ISSN 1572-8943. Dostupné z: doi:10.1023/A:1010114213475
- [66] CLELAND, Robert L. Enthalpy of Mixing Glycosaminoglycans with Aqueous NaCl. *Biopolymers* [online]. 1979, **18**(11), 2673–2681. ISSN 0006-3525. Dostupné z: doi:10.1002/bip.1979.360181104
- [67] BENEGAS, J. C., A. DI BLAS, S. PAOLETTI a A. CESÀRO. Some aspects of the enthalpy of dilution of biological polyelectrolytes. *Journal of thermal analysis* [online]. 1992, **38**(12), 2613–2620. ISSN 0022-5215. Dostupné z: doi:10.1007/BF01979737
- [68] JUGL, Adam. *Studium interakcí hyaluronan-aminokyseliny*. B.m., 2016. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [69] LE, Vu H., Robert BUSCAGLIA, Jonathan B. CHAIRES a Edwin A. LEWIS. Modeling complex equilibria in isothermal titration calorimetry experiments: Thermodynamic parameters estimation for a three-binding-site model. *Analytical Biochemistry* [online]. 2013, **434**(2), 233–241. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2012.11.030
- [70] BUCKIN, V.A., B.I. KANKIYA, A.P. SARVAZYAN a H. UEDAIRA. Acoustical investigation of poly(dA).poly(dT), poly[d(A-T)].poly[d(A-T)], poly(A) . poly(U) and DNA hydration in dilute aqueous solutions. *Nucleic Acids Research* [online]. 1989, **17**(11), 4189–4203. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/17.11.4189
- [71] MERZEL, F. a J. C. SMITH. Is the first hydration shell of lysozyme of higher density than bulk water? *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2002, **99**(8), 5378–5383. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.082335099
- [72] CHALIKIAN, Tigran V., Armen P. SARVAZYAN a Kenneth J. BRESLAUER. Hydration and partial compressibility of biological compounds. *Biophysical Chemistry* [online]. 1994, **51**(2–3), 89–109. ISSN 03014622. Dostupné z: doi:10.1016/0301-4622(94)85007-0
- [73] GALEMA, Saskia A. a Harald HOEILAND. Stereochemical aspects of hydration of carbohydrates in aqueous solutions. 3. Density and ultrasound measurements. *The Journal of Physical Chemistry* [online]. 1991, **95**(13), 5321–5326. ISSN 0022-3654. Dostupné z: doi:10.1021/j100166a073
- [74] ZANA, R. Studies of Aqueous Solutions of Polyelectrolytes by Means of Ultrasonic Methods. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* [online]. 1975, **12**(2), 165–189. ISSN 1532-1797. Dostupné z: doi:10.1080/15321797508076107
- [75] ISEMURA, Toshizo a Sachio GOTO. Studies of the Hydration and the Structure of Water and Their Roles in Protein Structure. II. The Hydration of Electrolytes by Ultrasonic Interferometry and Its Temperature Dependence. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* [online]. 1964, **37**(11), 1690–1693. ISSN 0009-2673. Dostupné z: doi:10.1246/bcsj.37.1690
- [76] CABANI, Sergio, Paolo GIANNI, Vincenzo MOLLICA a Luciano LEPORI. Group contributions to the thermodynamic properties of non-ionic organic solutes in dilute aqueous solution. *Journal of Solution Chemistry* [online]. 1981, **10**(8), 563–595. ISSN 0095-9782. Dostupné z: doi:10.1007/BF00646936
- [77] LAFONT, Virginie, Anthony A. ARMSTRONG, Hiroyasu OHTAKA, Yoshiaki KISO, L. MARIO AMZEL a Ernesto FREIRE. Compensating Enthalpic and Entropic Changes Hinder Binding Affinity Optimization. *Chemical Biology & Drug Design* [online]. 2007, **69**(6), 413–422. ISSN 1747-0277. Dostupné z: doi:10.1111/j.1747-0285.2007.00519.x

- [78] KAWASAKI, Yuko, Eduardo E. CHUFAN, Virginie LAFONT, Koushi HIDAKA, Yoshiaki KISO, L. MARIO AMZEL a Ernesto FREIRE. How Much Binding Affinity Can be Gained by Filling a Cavity? *Chemical Biology & Drug Design* [online]. 2010, **75**(2), 143–151. ISSN 17470277. Dostupné z: doi:10.1111/j.1747-0285.2009.00921.x
- [79] MERTINS, Omar a Rumiana DIMOVA. Binding of Chitosan to Phospholipid Vesicles Studied with Isothermal Titration Calorimetry. *Langmuir* [online]. 2011, **27**(9), 5506–5515. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la200553t
- [80] VONDRÁŠEK, Jiří, Philip E. MASON, Jan HEYDA, Kim D. COLLINS a Pavel JUNGWIRTH. The Molecular Origin of Like-Charge Arginine–Arginine Pairing in Water. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2009, **113**(27), 9041–9045. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/jp902377q
- [81] MONDEK, Jakub, Michal KALINA, Vasile SIMULESCU a Miloslav PEKAŘ. Thermal degradation of high molar mass hyaluronan in solution and in powder; comparison with BSA. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2015, **120**, 107–113. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2015.06.012
- [82] ALMOND, Andrew, John K. SHEEHAN a Andy BRASS. Molecular dynamics simulations of the two disaccharides of hyaluronan in aqueous solution. *Glycobiology* [online]. 1997, **7**(5), 597–604. ISSN 0959-6658. Dostupné z: doi:10.1093/glycob/7.5.597
- [83] VODRÁŽKA, Z. a J. KRECHL. *Bioorganická chemie*. 1. vyd. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, n.p., 1991. ISBN 80-03-00547-7.
- [84] YI, Hui-Yu, Munmun CHOWDHURY, Ya-Dong HUANG a Xiao-Qiang YU. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2014, **98**(13), 5807–5822. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-014-5792-6
- [85] CHEN, Hueih Min, Wei WANG, David SMITH a Siu Chiu CHAN. Effects of the anti-bacterial peptide cecropin B and its analogs, cecropins B-1 and B-2, on liposomes, bacteria, and cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 1997, **1336**(2), 171–179. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/S0304-4165(97)00024-X
- [86] WANG, Wei, David Keith SMITH a Hueih Min CHEN. The effect of pH on the structure, binding and model membrane lysis by cecropin B and analogs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 1999, **1473**(2–3), 418–430. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/S0304-4165(99)00200-7
- [87] SCOTT, J E, C CUMMINGS, A BRASS a Y CHEN. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochemical Journal* [online]. 1991, **274**(3), 699–705. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj2740699
- [88] VAARA, M a T VAARA. Ability of cecropin B to penetrate the enterobacterial outer membrane. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 1994, **38**(10), 2498–2501. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.38.10.2498
- [89] BALLWEBER, L. M., J. E. JAYNES, W. E. STAMM a M. F. LAMPE. In Vitro Microbicidal Activities of Cecropin Peptides D2A21 and D4E1 and Gel Formulations Containing 0.1 to 2% D2A21 against *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2002, **46**(1), 34–41. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.46.1.34-41.2002
- [90] HANCOCK, Robert EW. Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opinion on Investigational Drugs* [online]. 2000, **9**(8), 1723–1729. ISSN 1354-3784. Dostupné z: doi:10.1517/13543784.9.8.1723

7 ŽIVOTOPIS

OSOBNÍ INFORMACE

Jméno a příjmení

Adam Jugl

Adresa

28. října, 1031, Dvůr Králové nad Labem,
544 01

Datum a místo narození

30. 7. 1992, Hradec Králové

e-mail

xcjugl@fch.vut.cz

VZDĚLÁNÍ

2016 – nyní

Vysoké učení technické v Brně

Fakulta chemická

Typ studia: Doktorské

Dizertační práce: Interakce hyaluronan-aminokyseliny

2014 – 2016

Vysoké učení technické v Brně

Fakulta chemická

Typ studia: Navazující magisterské

Diplomová práce: Studium interakcí hyaluronan-aminokyseliny

2011 – 2014

Vysoké učení technické v Brně

Fakulta chemická

Typ studia: Bakalářské

Bakalářská práce: Charakterizace medicínských biopolymerů ultrazvukovou spektroskopií

PRACOVNÍ ZKUŠENOSTI

7/2015 – 8/2015

Stáž v Kemijski inštitut, Ljubljana, Slovinsko

6/2016 – 8/2016

Stáž ve společnosti Procter & Gamble

ZAHRANIČNÍ STÁŽE

9/2016 – 12/2016

Stáž na univerzitě v Záhřebu (Faculty of Science, University of Zagreb), prof. dr. sc. Davor Kovačević

VĚDECKÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST

Články v impaktovaném časopise

- JUGL, Adam a Miloslav PEKAŘ. Hyaluronan-Arginine Interactions—An Ultrasound and ITC Study. *Polymers* [online]. 2020, 12(9) [cit. 2020-10-20]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12092069

- JUGL, Adam, Andrea HURČÍKOVÁ a Miloslav PEKAŘ. Hysteresis during heating and cooling of hyaluronan solutions in water observed by means of ultrasound velocimetry. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, 165, 2419-2424 [cit. 2020-11-18]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.10.165
- HAVLÍKOVÁ, Martina, Jana SZABOVÁ, Adam JUGL, Ludmila MRAVCOVÁ, Chien-Hsiang CHANG, Po-Sung HUANG, Miloslav PEKAŘ a Filip MRAVEC. Study of cholesterol's effect on the properties of catanionic vesicular systems: Comparison of light-scattering results with ultrasonic and fluorescence spectroscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2020, 607 [cit. 2020-10-20]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2020.125526

Přednášky na mezinárodních konferencích

- International Conference and School on High Resolution Ultrasonic Spectroscopy (Brno, Česká republika)

Konferenční příspěvky indexované v databázi WoS nebo Scopus

- JUGL, A.; HEJNA, J.; PEKAŘ, M. HYALURONAN BASED NANOPARTICLES FORMED BY ELECTROSTATIC INTERACTIONS. In *NANOCON 2017 - Conference Proceedings, 9th International Conference on Nanomaterials - Research and Application*. Scopus. TANGER Ltd., 2018. p. 543-547. ISBN: 9788087294819. ISSN: 0250-4162.

Příspěvky na mezinárodních konferencích

- JUGL, A. Determination of Critical Micelle Concentration. *HRUS 2018 International Conference and School on High Resolution Ultrasonic Spectroscopy*. Brno: University College Bublin, 2018. p. 60-64.
- JARÁBKOVÁ, S.; LAŠTŮVKOVÁ, M.; JUGL, A.; VELCER, T.; SMILEK, J. PREPARATION AND RESEARCH OF COSMETIC EMULSIONS FROM SOLID TiO₂ AND EMULSIONS PREPARED FROM DISPERSION OF TiO₂. In *7th Meeting on Chemistry & Life. Czech Chemical Society Symposium Series. no 6 (2018)*. Praha: Česká společnost chemická, 2018. p. 493-495. ISSN: 2336-7210.
- JUGL, A.; PEKAŘ, M. STUDY OF ELECTROSTATIC INTERACTIONS BETWEEN HYALURONAN AND AMINO ACIDS. In *7th Meeting on Chemistry & Life. Czech Chemical Society Symposium Series. No 6*. Praha: Česká společnost chemická, 2018. p. 496-498. ISSN: 2336-7210.
- JUGL, A.; PEKAŘ, M. Studium interakcí hyaluronan-aminokyseliny. In *TERMOANALYTICKÝ SEMINÁŘ SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ*. Brno: ČSch, z.s., 2019. s. 89-95. ISBN: 978-80-88307-03-7.

Postery na mezinárodních konferencích

- 12th International Conference on Hyaluronan (Cardiff, Velká Británie)
- 7th Meeting on Chemistry and Life 2018 (Brno, Česká republika)
- International Workshop: "Recent applications of high-resolution ultrasonic spectroscopy for monitoring of hydrolytic activities in milks" (Dublin, Irsko)
- 9th International Conference on Nanomaterials - Research & Application (Brno, Česká republika)

Abstrakty

- JUGL, A.; PEKAŘ, M.; HEJNÁ, J. Hyaluronan Based Nanoparticles Formed by Electrostatic Interactions. NANOCON 2017 - ABSTRACTS. 1st Edition, 2017. Ostrava: TANGER Ltd., 2017. p. 127-127. ISBN: 978-80-87294-78-9.
- JUGL, A.; KARGEROVÁ, A. High resolution ultrasonic spectroscopy used for the study of thermal behavior of hyaluronan. International Workshop: "Recent applications of high-resolution ultrasonic spectroscopy for monitoring of hydrolytic activities in milks". Belfield 4, Dublin, Ireland: School of Chemistry, University College Dublin, 2017. p. 14-14.
- JARÁBKOVÁ, S.; LAŠTŮVKOVÁ, M.; JUGL, A.; VELCER, T.; SMILEK, J. Preparation and research of cosmetic emulsions from solid TiO₂ and emulsions prepared from dispersion of TiO₂. 7th Meeting on Chemistry nad Life 2018. Book of abstracts. Ing. Petr Dzik, Ph.D. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2018. p. 77-77. ISBN: 978-80-214-5488-0.
- JUGL, A.; PEKAŘ, M. STUDY OF ELECTROSTATIC INTERACTIONS BETWEEN HYALURONAN AND AMINO ACIDS. 7th Meeting on Chemistry and Life 2018. Book of abstracts. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2018. p. 77-77. ISBN: 978-80-214-5488-0.
- JUGL, A.; KARGEROVÁ, A. Characterization of hyaluronic acid by high resolution ultrasonic spectroscopy. HRUS 2018 International Conference and School on High Resolution Ultrasonic Spectroscopy (HR-US) Final Program, Book of Abstract, and Practical Courses. Brno: Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, 2018. p. 32-32.
- JUGL, A.; PEKAŘ, M. Study of electrostatic interactions between hyaluronan and amino acids. Hyaluronan 2019. 1st. Cardiff: International Society of Hyaluronan Sciences, 2019. p. 75-75.

PEDAGOGICKÁ ČINNOST

2017 – 2019

Chemická informatika I – výuka cvičení

2017 – 2019

Chemická informatika II – výuka cvičení

OCENĚNÍ

2018

Cena děkana za vynikající studijní výsledky

8 PŘÍLOHY

Tabulka P 1: Shrnutí výsledků vizuálních pozorování titrací ve vodě.

Oligomer Arg	Vizuální pozorování / Hya Mw (kDa)
Dimer a tetramer	Beze změny.
Oktamer	9 kDa – Tvorba slabě zakalených roztoků, které se vyčeřily při vyšších molárních poměrech (pravděpodobně díky nízkému pH). 1540 kDa – Tvorba slabě zakalených roztoků, které se mění ve sraženinu s mírným zákalem kolem molárního poměru 1. Nedochází k rozpadu vlivem nízkého pH.
Oktamer upravené pH	9 kDa – Intenzivní zákal, nerozpouští se jako v případě roztoků s neupravovaným pH. 1540 kDa – Nebylo vizuálně testováno, hyaluronan s touto molekulovou hmotností interaguje i bez úpravy pH
Dekamer	9 kDa – tvorba slabě zakalených roztoků 310 kDa – tvorba intenzivně zakalených roztoků 1 540 kDa – formování zakalených roztoků, které se mění ve sraženinu kolem molárního poměru 1,2 a roztok zůstává čirý.
Dodekamer	9 kDa – tvorba slabě zakalených roztoků 1540 kDa – formování zakalených roztoků, které se mění ve sraženinu kolem molárního poměru 1,1 a roztok zůstává čirý.
Triakontamer	9 kDa – tvorba intenzivně zakalených roztoků, které se mění ve sraženinu a slabě zakalený roztok kolem molárního poměru 1,0. 1 540 kDa – tvorba intenzivně zakalených roztoků, které se mění ve sraženinu a čirý roztok kolem molárního poměru 1

Tabulka P 2: Shrnutí výsledků vizuálních pozorování v prostředích s různou koncentrací chloridu sodného.

Oligomer Arg	Vizuální pozorování / Hya Mw (kDa)
Dodekamer	Hya 680 kDa Voda – tvorba zakalených roztoků, které se mění ve sraženinu a čirý roztok kolem molárního poměru 1,1 100 mM NaCl – tvorba slabě zakalených roztoků, které se mění ve sraženinu a slabě zakalený roztok kolem molárního poměru 1,1 150 mM NaCl – velmi slabě zakalený roztok pozorovatelný kolem molárního poměru 1,5
Dekamer 50 mM NaCl	9 kDa – tvorba slabě zakalených roztoků 1 540 kDa – tvorba intenzivně zakalených roztoků, které se mění v precipitát a čirý roztok kolem molárního poměru 1
Dekamer 10 mM NaCl	9 kDa – tvorba intenzivně zakalených roztoků 1 540 kDa – tvorba intenzivně zakalených roztoků, které se mění ve sraženinu a čirý roztok kolem molárního poměru 1

Tabulka P 3: Shrnutí výsledků vizuálního pozorování jednotlivých titrací v PBS

Oligomer Arg	Vizuální pozorování / Hya Mw (kDa)
Triakontamer	9 kDa – tvorba slabě zakalených roztoků 1 540 kDa – tvorba slabě zakalených roztoků, které se mění ve sraženiny a čirý roztok kolem molárního poměru 1,5
Dodekamer	Roztok zůstává čirý se všemi testovanými molekulovými hmotnostmi
Dekamer	Roztok zůstává čirý se všemi testovanými molekulovými hmotnostmi

Tabulka P 4: Shrnutí výsledků jednotlivých vizuálních pozorování titrací cecropinu B do hyaluronanu ve vodě a PBS.

Cecropin B	
Hya Mw (kDa)	Vizuální pozorování
Voda	
9	Tvorba velmi jemně zakalených roztoků, které se mění na čirý roztok kolem molárního poměru 1,5.
680	Tvorba zákalu, který přechází v neprůhledný vzorek a následně vytváří sraženiny kolem molárního poměru 1,4. Dále se systém vizuálně nemění.
1 540	Tvorba zákalu, který přechází v neprůhledný vzorek a následně vytváří sraženiny kolem molárního poměru 1,4. Dále se systém vizuálně nemění.
PBS	
9	Roztok zůstává čirý.
1 1540	Roztok zůstává čirý.